

Aus dem
Berlin Institute of Health at Charité (BIH)
Vorsitzender des BIH Direktoriums: Prof. Dr. Christopher Baum
und dem
CharitéCentrum 13 für Innere Medizin mit Gastroenterologie und Nephrologie
Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
Charité Campus Benjamin Franklin
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Britta Siegmund

Habilitationsschrift

Molekulare Mechanismen adaptiver und maladaptiver kardiovaskulärer Remodellingprozesse

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin m.S. Kardiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Angelika Kusch, geb. Weis

Eingereicht: August 2021
Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries
1. Gutachter: Prof. Dr. Hermann Pavenstädt, Münster
2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Zirlik, Graz

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	3
1. Einleitung.....	6
1.1 Klinischer Kontext.....	6
1.2 Zusammenfassung des aktuellen Erkenntnisstandes der Pathomechanismen der Atherosklerose.....	8
Frühe Entwicklungsphasen der Atherosklerose.....	8
Progression der Atherosklerose.....	9
„Vulnerable Plaques“.....	11
Beitrag des fibrinolytischen Systems.....	12
1.3 Zielstellung der Arbeit.....	13
2. Eigene Arbeiten.....	15
2.1 Urokinase stimuliert Migration glatter Gefäßmuskelzellen durch eine Interaktion der Phosphatidylinositol-3-Kinase mit Tyk2.....	15
2.2 Von Monozyten freigesetzte Urokinase hemmt das Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen durch Aktivierung von STAT1.....	25
2.3 Das Tight Junction Protein ZO-2 steuert die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen über eine Regulation von STAT1.....	33
2.4 Rosuvastatin reguliert die phänotypische Modulation glatter Gefäßmuskelzellen beim vaskulären Remodelling: Rolle für den Urokinaserezeptor.....	43
2.5 17β-Östradiol reguliert die Sensitivität von mTORC2 für Rapamycin beim adaptiven kardialen Remodelling.....	53
3. Diskussion.....	76
4. Zusammenfassung.....	84
5. Literaturangaben.....	85
Danksagung.....	99
Eidesstattliche Erklärung.....	100

Abkürzungen

Akt	Proteinkinase B
AP-1	<i>Activator protein 1</i> (Aktivierendes Protein 1)
ApoE ^{-/-}	Apolipoprotein E defizient
B-Zelle	Lymphozyt mit B-Zell-Rezeptoren (membrangebundene Immunglobuline)
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CD36	<i>Cluster of differentiation 36</i> (auch Plättchen-Glykoprotein 4)
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding proteins</i>
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i> (Coronaviruskrankheit 2019)
CRP	C-reaktives Protein
DES	<i>Drug-eluting stents</i> (arzneimittelfreisetzende Stents)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2	17 β -Estradiol
ERK	<i>Extracellular regulated kinase</i> (extrazellulär regulierte Kinase)
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i> (fokale Adhäsionskinase)
ER α	Östrogenrezeptor α
ER β	Östrogenrezeptor β
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-13	Interleukin 13
INF- γ	Interferon gamma
Jak	Januskinase
Jak1	Januskinase 1
Jak2	Januskinase 2
Jak3	Januskinase 3
KLF2	Transkriptionsfaktor <i>Krüppel-like factor 2</i>
KLF4	Transkriptionsfaktor <i>Krüppel-like factor 4</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> (Lipoprotein niedriger Dichte)

lncRNA	<i>Long noncoding RNA</i> (lange, nichtkodierende RNA)
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (Mitogen aktivierte Proteinkinase)
MCP-1	Monozyten-chemoattraktives Protein 1
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> (Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase)
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i> (Myosin-Leichtkettenkinase)
microRNA	Mikro Ribonukleinsäuren (kurze, hoch konservierte, nichtcodierende RNAs)
miRNA 221/222	microRNA 221/222
MMP-9	Matrixmetalloproteinase 9
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MSC	mesenchymale Stammzellen
M1 Phänotyp	stark pro-inflammatorischer Makrophagenphänotyp
MRTFs	Myocardin-verwandte Transkriptionsfaktoren A und B
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC1	mTOR Komplex 1
mTORC2	mTOR Komplex 2
mTORis	mTOR Inhibitoren
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFATc1	<i>nuclear factor of activated T cell 1</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> (spezifischer Transkriptionsfaktor aktivierter B-Zellen)
NLRP3	<i>NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3</i>
Oct4	Octamer-Bindungs-Transkriptionsfaktor
OPTICO-ACS	<i>Optical Coherence Tomography in Acute Coronary Syndrome</i>
oxLDL	oxidiertes LDL
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
PCI	<i>Percutaneous coronary intervention</i> (Perkutane Koronarintervention)
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i> (Wachstumsfaktor aus Thrombozyten)
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
RAS	Rat sarcoma, kleines G-Protein Proto-Onkogen
RNA	Ribonukleinsäure
Rictor	<i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i> (Rapamycin-unempfindlicher Komplexpartner von mTOR)

ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
SERCA2A	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2A</i> (Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums)
SH2	Src-homology 2 (Proteindomäne, abgeleitet von der Proteinkinase c-Src, in der diese Domäne erstmals beschrieben wurde)
SMAD3	<i>signal transducer and transcriptional modulator family member 3</i> ; Familie von Signalvermittlern von TGF- β -Rezeptoren, die Zellentwicklung und Wachstum regulieren (Abkürzung nimmt Bezug auf Homologen zu <i>Caenorhabditis elegans</i> – “ <i>small</i> ” Wurm Phänotyp und MAD-Familie-Gene von <i>Drosophila</i> (“ <i>mothers against decapentaplegic</i> ”))
SREBP-1	Sterol-regulierendes Bindungsprotein 1
Src-Kinasen	Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase, erstmalig als Gen-Produkt des v-src (virales src) des Rous-Sarkom-Virus beschrieben
SRF	<i>Serum response factor</i> (Serum-Antwortfaktor)
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
STAT2	<i>Signal transducer and activator of transcription 2</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
STAT4	<i>Signal transducer and activator of transcription 4</i>
suPAR	<i>soluble uPAR</i> (löslicher uPAR)
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR4	<i>Toll-like</i> Rezeptor 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
tPA	<i>tissue-type plasminogen activator</i> (Gewebe-Typ Plasminogen Aktivator)
Tyk2	Tyrosin Kinase 2
T-Zelle	im Thymus ausdifferenzierter Lymphozyt
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
uPAR	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator-Rezeptor
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i> (Gefäßzelladhäsionsprotein 1)
VLA4	<i>Very-late antigen-4</i> (Integrin $\alpha 4 \beta 1$)
VSMC	<i>Vascular smooth muscle cells</i> (glatte Gefäßmuskelzellen)
Wnt	<i>Wingless and Int-1</i>
ZO-2	<i>Zonula occludens Protein 2</i> (Tight Junction Protein 2)

1. Einleitung

1.1. Klinischer Kontext

Kardiovaskuläres Remodelling ist ein stetiger Prozess der normalen physiologischen oder nur unzureichend erfolgreichen, bzw. krankhaften, pathologischen Anpassung der beteiligten Zellen und Organe des kardiovaskulären Systems an Stresssituationen. Er beginnt bereits in der Embryonalentwicklung und erfordert erste signifikante biochemische und anatomische Anpassungen beim Übergang vom intrauterinen zum extrauterinen Leben.¹ Im weiteren Verlauf wird er durch endogene genetische und epigenetische Faktoren²⁻⁷, Schwangerschaft^{8, 9}, Begleiterkrankungen, wie z.B. arterielle Hypertonie, chronische Nieren- und Lebererkrankungen, Diabetes mellitus und Erkrankungen mit systemischer Inflammation und metabolischen Störungen¹⁰⁻¹⁶, aber auch exogene Faktoren, wie Rauchen, Alkohol und Drogen, Ernährung, körperliche Inaktivität^{17, 18} und nicht zuletzt Alterungsprozessen der Organe, bzw. des gesamten Organismus¹⁹⁻²¹ beeinflusst.

Unter pathologischen Remodellingprozessen hat die Atherosklerose die größte klinische Bedeutung. Der Begriff Atherosklerose umschreibt die Bildung fibröser, fettiger Läsionen in der Gefäßwand von Arterien.²² Sie stellt weltweit die Hauptursache für Gefäßerkrankungen dar.²³ Die relevantesten klinischen Manifestationen sind die ischämische Herzerkrankung, der ischämische Schlaganfall und die periphere arterielle Verschlusskrankheit.²³

Die erste große systematische Observationsstudie zum Verlauf und Verständnis kardiovaskulärer Erkrankungen und Risikofaktoren begann 1948 mit der Framingham-Herz-Studie. Sie identifizierte hohen Cholesterinspiegel, erhöhten Blutdruck und erhöhten Blutzucker als Risikofaktoren und weitere begünstigende Faktoren, wie Zigarettenrauchen, Bewegungsmangel, Gewichtszunahme und Fehlernährung.²⁴ Neuere Studien bestätigten, dass ein großer Teil der kardiovaskulären Erkrankungen (in absteigender Reihenfolge) auf Diät, hohen systolischen Blutdruck, hoher Body Mass Index, hohe Cholesterinspiegel, hohe Nüchtern-Plasmaglukosespiegel, Zigarettenrauch und geringe körperliche Aktivität zurückzuführen sind.²⁵ Allerdings ist die Atherosklerose nicht erst eine Erkrankung der Neuzeit, wie Befunde bei Mumien aus dem alten Ägypten und von Ötzi, der 5300 Jahre alten Eiszeit-Mumie, zeigen.^{26, 27}

Bezüglich der Therapie der Atherosklerose hatten die Erkenntnisse über die pathophysiologische Rolle von Cholesterin und der Lipoproteine und die Entwicklung der Statine

große Hoffnungen geweckt. Im Jahre 1985 erhielten Michael S. Brown und Joseph L. Goldstein den Nobelpreis in Physiologie oder Medizin für ihre Entdeckungen über die Regulation des Cholesterinmetabolismus.²⁸ Elf Jahre später beschrieben sie ihre Erwartungen in einem Editorial in Science mit dem Titel “Heart Attacks: Gone with the Century ?” so: “Heart attacks were recognized as a public health problem only in this century. They are likely to lose this notoriety early in the next.”²⁹

Diese Erwartung hat sich leider nicht erfüllt. Die Inzidenz und Mortalität der ischämischen Herzerkrankung und des ischämischen Schlaganfalls sind zwar seit der Mitte des 20. Jahrhunderts in Ländern mit hohem Einkommen dramatisch zurückgegangen, in anderen Ländern, insbesondere in osteuropäischen Ländern und Asien, sind die Trends unterschiedlich.²³ Weiterhin sind dennoch auch in Deutschland Herzerkrankungen, dabei führend die chronische ischämische Herzkrankheit, im Vergleich zu Krebserkrankungen oder anderen Erkrankungen immer noch die häufigste Todesursache.³⁰ Auch weltweit stehen kardiovaskuläre Erkrankungen an 1. Stelle der Todesursachen. Jährlich sterben ca. 17,9 Millionen Menschen an diesen Erkrankungen, davon mehr als 80 % aufgrund von Herzinfarkten und Schlaganfällen und mehr als ein Drittel davon sind Menschen, die jünger als 70 Jahre alt sind.³¹ Die weltweite Prävalenz der ischämischen Herzkrankheit stieg von über 100 Millionen im Jahre 1990 auf über 180 Millionen Betroffene im Jahr 2019.³² Bemerkenswert ist es außerdem, dass in der letzten Zeit immer mehr jüngere Menschen, Frauen und Individuen verschiedenster ethnischer Herkunft von atherosklerotischen Erkrankungen betroffen sind und dies nicht nur in Industrieländern, sondern zunehmend auch in Entwicklungsländern.³³ Diese Entwicklungen sind nicht zuletzt auf den starken Anstieg des Metabolischen Syndroms, gekennzeichnet von Übergewicht, Bluthochdruck, sowie Zucker- und Fettstoffwechselstörungen zurückzuführen.³⁴

Trotz moderner Medikamente mit substanzieller *Low density lipoprotein* (Lipoprotein niedriger Dichte, LDL) Senkung, hocheffektiver Präventivmaßnahmen, die vom Aufhören des Rauchens bis zur Therapie der arteriellen Hypertonie reichen, perkutaner oder chirurgischer Revaskularisierungsmaßnahmen, neuer Therapieansätze durch ein erweitertes Verständnis der Pathomechanismen der Atherosklerose, wie z.B. dem Einfluss des Mikrobioms, Schlafstörungen, Luftverschmutzung und anderer Umweltbelastungen, sowie neuer Biomarker, wie z.B. Mikro-Ribonukleinsäuren (microRNA), bleibt das Monitoring und die Therapie der Atherosklerose und ihrer Organmanifestationen weiterhin eine große klinische Herausforderung.³⁵⁻³⁸

1.2 Zusammenfassung des aktuellen Erkenntnisstandes der Pathomechanismen der Atherosklerose

Frühe Entwicklungsphasen der Atherosklerose

Die normale Gefäßwand von Arterien besteht aus drei Schichten: Innen zum Blutstrom hin liegt die aus einem Monolayer von Endothelzellen bestehende Intima, nach außen hin folgt die Media, die aus ruhenden glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) und extrazellulärer Matrix besteht und danach die Adventitia, die Nervenendigungen, Mastzellen und Vasa vasorum enthält, die die äußere Schicht der Media mit Nährstoffen versorgen.²² Stressreize durch kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie z.B. Toxine und inflammatorische Reaktionen mit Freisetzung von Zytokinen können dazu führen, dass die Endothelzellen Leukozytenadhäsionsmoleküle, wie z.B. *Vascular cell adhesion protein 1* (Gefäßzelladhäsionsprotein 1, VCAM-1) exprimieren, worüber sie mit dem *very-late antigen-4* (Integrin $\alpha 4 \beta 1$, VLA4) -Liganden auf monozytären Blutzellen interagieren und zum Rolling und einer Adhärenz von Monozyten und Lymphozyten an den Endothelzellen führen.²² Chemokine fördern das Einwandern der Leukozyten in die Intima, wo sie proliferieren und durch Aufnahme von Lipiden zu Schaumzellen, dem Kennzeichen atherosklerotischer Läsionen werden.³⁹ Hohe Insulinspiegel mit Insulinresistenz, reduziertes Insulinsignalling in Makrophagen oder Dyslipidämien fördern einen proinflammatorischen Makrophagenphänotyp und damit ein Voranschreiten der Atherosklerose.⁴⁰ Neben den Monozyten wandern auch eine geringere Zahl an im Thymus ausdifferenzierte Lymphozyten (T-Zellen) in die Intima ein und regulieren sowohl die Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Mastzellen, natürliche Killerzellen, Phagozyten und Granulozyten, als auch Endothel- und glatte Gefäßmuskelzellfunktionen.⁴¹ Beim Menschen finden sich, anders als bei Nagetieren auch residente glatte Muskelzellen in der Media.⁴² Darüber hinaus können glatte Muskelzellen, die normalerweise in der Media lokalisiert sind, in die Intima einwandern, proliferieren und extrazelluläre Matrix bilden.⁴³ Nicht nur in Makrophagen, sondern auch in VSMC wurden schon früh Lipidtröpfchen beschrieben.⁴⁴ Neuere tierexperimentelle Daten belegen, dass auch Zellen, die ursprünglich glatte Gefäßmuskelzellen waren, zu Schaumzellen werden können.⁴³

Lange Zeit ging man davon aus, dass oxidiertes LDL eine führende Rolle bei der Entstehung der atherosklerotischen Läsionen spielt. Inzwischen weiß man, dass auch natives oder aggregiertes LDL atherogene Wirkung haben kann. Oxidiertes LDL kann hingegen auch antiatherogene Effekte vermitteln.⁴⁵ LDL kann auf verschiedene Art und Weise modifiziert werden,

was seine Größe, Dichte und chemischen Eigenschaften im Blut und an der Gefäßwand verändert.⁴⁵ Genetische Studien haben viel zum Verständnis der Bedeutung einzelner Lipidformen und deren Modifikationen beigetragen und neue therapeutische Targets identifiziert.⁴⁶ Nach heutigem Verständnis spielen bei der Entstehung der Atherosklerose zwei Prozesse eine wesentliche Rolle. Zum einen sind dies die intrazelluläre Lipidanreicherung, die hauptsächlich Cholesterin und seine Ester betrifft, und zum anderen die inflammatorische Antwort der Zellen in der Gefäßwand, die aus dem Blut in den subendothelialen Raum der Intima rekrutiert werden, wo sie zu Makrophagen differenzieren.⁴⁵

Die Hauptquelle der intrazellulären Cholesterinanreicherung ist multipel modifiziertes LDL⁴⁷. Atherogenes, multipel modifiziertes LDL kann im Blut von Patienten mit Atherosklerose nachgewiesen werden und triggert intrazelluläre Fettanreicherung an Prädilektionsstellen, wie Gefäßverzweigungen mit turbulentem Fluss oder einer geringen Scherspannung.^{44, 48}

Wenn auch die pathogene Wirkung von erhöhtem LDL wissenschaftlich auf vielfältigste Weise bewiesen ist,⁶ ist nun die Inflammation als zusätzlicher Kernpunkt der Atherogenese in den Mittelpunkt gerückt und Ziel vieler neuer Therapieansätze.⁴⁹ Zahlreiche Studien beschäftigen sich z.B. derzeit mit der Regulation der Phänotypen von Makrophagen, um Plaqueregression zu erzielen.⁵⁰ Die Relevanz inflammatorischer Mechanismen wird zusätzlich durch Biomarkerstudien unterstützt, die gezeigt haben, dass Indikatoren für Inflammation das kardiovaskuläre Risiko bei Individuen mit oder ohne manifester kardiovaskulärer Erkrankungen vorhersagen können.⁵¹

Inflammatorische Zellantworten bieten ein großes Repertoire an Signalwegen, die Lipide und andere traditionelle Risikofaktoren in der Pathogenese der Atherosklerose miteinander in Verbindung bringen.⁴² Die inflammatorischen Prozesse und das Zusammenspiel zwischen angeborener und adaptiver Immunität nehmen eine fundamentale Rolle nicht nur bei der Entstehung der Primärläsion, sondern auch bei der Progression und klinischen Manifestationen der Atherosklerose ein.^{41, 42}

Progression der Atherosklerose

Der weitere Verlauf der atherosklerotischen Läsionen wird von einem Wechselspiel zwischen pro- und anti-inflammatorischen Reizen und „*pro-resolving*“ Mediatoren (Klasse von Signalmolekülen aus dem Metabolismus von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die die Auflösung von Entzündungsprozessen fördern⁵²) bestimmt. Dabei ist hier nicht, wie früher vermutet, von einem unbeeinflussbaren, kontinuierlichen Prozess auszugehen.³³ Episodische lokale oder

systemische Inflammation können schubartig zu schnellem Atheromwachstum führen gefolgt von stabileren Phasen. Auslöser dafür können z.B. auch psychische Stresssituationen sein. Diese, wie auch Umwelteinflüsse, Schlafstörungen, körperliche Inaktivität, ungünstige Ernährung, läsionsferne Verletzungen oder Infektionen können über Veränderungen der Hämatopoese inflammatorische Leukozyten induzieren, die die Inflammation im Plaque aufrechterhalten oder verstärken.⁵³ Es ist bekannt, dass durch die Lernfähigkeit des Immunsystems repetitive Stimuli zudem zu übersteigerten Immunreaktionen führen können.^{54, 55}

Mit zunehmendem Wachstum der intimalen Läsionen proliferieren Makrophagen. *Platelet derived growth factor* (Wachstumsfaktor aus Thrombozyten, PDGF) fördert die Migration und Proliferation von VSMC, die extrazelluläre Matrix produzieren. Die Zellen im Plaque sezernieren Zytokine⁵⁶, die T-Helferzellen 1 aktivieren, die *Interferon gamma* (IFN- γ) produzieren, Phagozyten aktivieren und so den atherosklerotischen Prozess weiter vorantreiben.³³ Untergegangene oder apoptotische Makrophagen und VSMC, die nicht effektiv phagozytiert werden, führen zur Ausbildung eines zentralen lipidreichen bzw. nekrotischen Kerns, der kennzeichnend für das fortgeschrittene Atherom ist.²²

VSMC können sehr unterschiedliche Rollen im Verlauf der Atherogenese einnehmen. Dieser Zelltyp ist sehr komplex. Die VSMC stellen in den Plaques keine homogene Zellpopulation dar, sondern sind von phänotypischen Veränderungen geprägt. Zudem ist häufig eine Differenzierung von Makrophagen anhand klassischer Zellmarker schwierig. VSMC können sich vom differenzierten, kontraktilen Phänotyp in undifferenzierte Formen wandeln, die u.a. phänotypisch Schaumzellen, Makrophagen, mesenchymalen Stammzellen und osteochondrogenen Zellen ähneln. Die Proliferation von VSMC hingegen wird eher als protektiv, plaquestabilisierend angesehen. Im Gegensatz dazu verstärken VSMC Apoptose, Seneszenz und zu Makrophagen-ähnlichen Zellen entwickelte VSMC die Inflammation und wirken proatherogen.^{43, 57, 58}

Neben den klassisch aktivierten Makrophagen (M1 Phänotyp), die die pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 12 (IL-12) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) sezernieren, können Zytokine, wie Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) M2-Phänotyp Makrophagen induzieren, die anti-inflammatorische Zytokine, wie Interleukin 10 (IL-10) und *Transforming growth factor beta* (TGF- β) freisetzen.⁵⁶ TGF- β kann die Entzündungsreaktionen und die Proliferation der VSMC begrenzen und die Synthese von interstitiellem Kollagen

steigern, was die Ausbildung einer stabilisierenden fibrösen Kappe fördert.⁵⁹ Auch Lymphozyten mit B-Zell-Rezeptoren (B-Zellen) sind an der Regulation der Plaqueprogression beteiligt. Zum einen können B-Zellen auch pro- und anti-inflammatorische Zytokine freisetzen und T-Zellen aktivieren, zum anderen können sie Antikörper bilden gegen oxidationspezifische Epitope oder andere Epitope von LDL oder sterbenden Zellen.⁶⁰

Neuere Studien weisen auf eine wichtige Rolle von extrazellulären Vesikeln bei der Progression der Atherosklerose hin.⁶¹ Aktivierte und apoptotische Zellen können Zellpartikel oder Vesikel, die Proteine, Lipide, *Desoxyribonukleinsäure* (DNA) und RNA enthalten, freisetzen, die von anderen Zellen aufgenommen werden und damit der interzellulären Kommunikation dienen. Diese membrangebundenen extrazellulären Vesikel werden je nach Entstehung und Größe als Mikrovesikel, Exosomen oder apoptotische Körperchen bezeichnet. Dabei bestimmt der Inhalt dieser Vesikel, ob sie die Atherogenese fördern oder hemmen. Der durch Scherspannung regulierte Transkriptionsfaktor *Krüppel-like factor 2* (KLF2) z.B. steuert die Genexpression von Endothelzellen. Unter Scherspannung exprimieren die Endothelzellen vermehrt spezifische microRNA und microRNA-Cluster, die über extrazelluläre Vesikel den Phänotyp der VSMC beeinflussen können.⁶²⁻⁶⁵ Die Produktion solcher Exosomen und Zusammensetzung ihrer Inhalte können dabei durch Statine verändert werden.⁶⁶

Neben microRNA sind auch lange, nichtkodierende RNAs (lncRNA) bei der Neointimabildung und Stabilisierung des kontraktiven Phänotyps der VSMC von Bedeutung.⁶⁵

„Vulnerable Plaques“

Wie zuvor beschrieben, können VSMC effektiv durch Ausbildung einer fibrösen Kappe dazu beitragen, die Plaque zu stabilisieren.²² Andererseits kann z.B. von T-Zellen sezerniertes IFN- γ die Fähigkeit der VSMC beeinträchtigen, interstitielles Kollagen zu bilden und inflammatorische Zellen stimulieren, vermehrt Kollagenasen freizusetzen, so dass die fibröse Kappe dünner wird und aufbrechen kann („Plaqueruptur“). Blut und koagulatorische Proteine kommen dabei in Kontakt mit thrombogenen Substanzen aus der Plaque, wie z.B. *tissue* Faktor, und es kommt zu einer akuten Thrombosierung des Gefäßes.⁶⁷

Neuere bildgebende Verfahren deuten jedoch auf weitere Mechanismen hin, die z.B. in der *Optical Coherence Tomography in Acute Coronary Syndrome* (OPTICO-ACS) Studie doppelt so häufig zu akuten Koronarsyndromen führten wie akute Plaquerupturen.⁶⁸ Es sind sogenannte „Plaque-Erosionen“. Die in dieser Studie auch immunphänotypisch untersuchten „*culprit lesions*“ (für das Auftreten des akuten Koronarsyndroms verantwortliche atherosklerotische

Plaque) wiesen bei Plaque-Erosionen einen geringeren Fettgehalt, weniger Kalzifikationen und eine dickere überziehende fibröse Kappe auf als die Läsionen mit Plaqueruptur. Sie waren zumeist in der Nähe von Koronarbifurkationsstellen lokalisiert. Es fanden sich mehr *cluster of differentiation 8* (CD8) positive, zytotoxische T-Lymphozyten und deren Effektormoleküle Granzym A, Perforin und Granulysin, die zum Absterben von Endothelzellen beitragen.⁶⁸ Weitere Pathomechanismen von Plaque-Erosionen sind die durch Scherspannung und degradiertes Hyaluron (im Rahmen von VSMC Aktivierung produzierte veränderte extrazelluläre Matrix) aktivierte Endothelzellen, die Neutrophile anlocken und eine Plättchenaktivierung und Thrombose induzieren. Dabei spielt auch, sowohl bei der Thrombogenese, als auch dem Thrombuswachstum, die Ausbildung neutrophiler Netzwerke extrazellulärer Fasern (*neutrophil extracellular traps*) eine wichtige Rolle.^{58, 69, 70}

Bezüglich der klinischen Relevanz atherosklerotischer Läsionen finden sich interessanterweise Unterschiede in der Plaquezusammensetzung zwischen Frauen und Männern. Eine aktuelle computertomografische randomisierte Multizenterstudie zeigte, dass Frauen mit stabiler Angina pectoris geringere atherosklerotische Plaques jeglicher Art, darunter kalzifiziert, nichtkalzifiziert oder „*low-attenuation-Plaques*“ (typischerweise lipidreiche Plaques, deren Kern nekrotische Anteile aufweist) hatten und seltener Herzinfarkte erlitten. Diejenigen, die jedoch in der Folgezeit einen Herzinfarkt bekamen, hatten ein insgesamt gleiches Ausmaß an nichtkalzifizierten und „*low-attenuation-Plaques*“ wie Männer. Männer jedoch zeigten zusätzlich mehr hochgradig kalzifizierte Plaques. Für das Herzinfarkttrisiko entscheidend war nur das Ausmaß der lipidreichen, nekrotischen Plaques unabhängig von Kalkgehalt, Obstruktion, kardiovaskulärem Risikoscore und Geschlecht.⁷¹

Beitrag des fibrinolytischen Systems

Das fibrinolytische System, bestehend aus Plasmin(ogen), seinen Aktivatoren Gewebetyp-Plasminogen Aktivator (tPA) und Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) sind zum einen für die Auflösung von Thromben zuständig, wobei tPA in seiner Aktivität, Plasminogen in Plasmin zu spalten im Wesentlichen von Fibrin abhängig ist. uPA wird dagegen als Fibrin-unabhängiger Aktivator von Plasminogen angesehen. Beide agieren v.a. lokal am Ort des Thrombus und zirkulierende Inhibitoren wie Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) und α 2-Antiplasmin verhindern unter normalen Bedingungen eine systemische Plasminaktivierung.⁷² Darüber hinaus haben diese Moleküle weitere wichtige regulatorische Funktionen in der Pathogenese der Atherosklerose, wie Zellmigration, Zellproliferation,

phänotypische Veränderungen der Zellen, Umgestaltung der extrazellulären Matrix, Angiogenese, Immunreaktionen und inflammatorischen Prozessen.⁷²⁻⁷⁶

In humanen atherosklerotischen Läsionen zeigen Makrophagen und VSMC eine hohe Expression von uPA und dessen spezifischen Rezeptors, des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator-Rezeptors (uPAR), die mit dem Ausmaß der Erkrankung korreliert.^{73, 77} Insbesondere in der Intima früher atherosklerotischer Läsionen, sowie der fibrösen Plaquekappe konnten eine besonders hohe Expressionen des uPAR im Vergleich zu makroskopisch unauffälligen Arealen nachgewiesen werden.⁷⁸ Die pathomechanistische pro-atherogene Relevanz wurde in vielfältigen genetischen Studien mit Hemmung von Komponenten des fibrinolytischen Systems gezeigt.⁷⁹⁻⁸³

Es bestehen auch Verbindungen zwischen dem uPA/uPAR-System und dem Fettmetabolismus von Zellen. U.a. haben Studien gezeigt, dass uPA über die Aktivierung des uPAR Sterol-regulierendes Bindungsprotein 1 (SREBP-1) hochreguliert und damit die Biosynthese von Cholesterin in Makrophagen stimuliert.^{84, 85}

Der uPAR ist an der Zellmembran nur durch einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker angeheftet und kann durch Spaltung durch endogene Phospholipase D abgelöst werden und als löslicher uPAR (suPAR) in die Zirkulation gelangen.⁸⁶ suPAR korreliert positiv mit dem Aktivierungsgrad des Immunsystems, Entzündungen und der Schwere von Erkrankungen nicht nur im Kontext von Atherosklerose, sondern auch bei Tumoren, Virusinfektionen, wie *coronavirus disease 2019* (Coronaviruskrankheit 2019, COVID-19) und chronischen Nierenerkrankungen.⁸⁷⁻⁸⁹ In einem Mausmodell mit diätinduzierter Atherosklerose konnte gezeigt werden, dass therapeutische Überexpression von suPAR zu einer deutlichen Reduktion der atherosklerotischen Läsionen führte und geringere Makrophagen in den Läsionen nachweisbar waren. suPAR wirkte dabei kompetitiv zum membrangebundenen endogenen uPAR.⁹⁰

Bezüglich der Eignung von suPAR als Biomarker für kardiovaskuläres Risiko finden sich widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur.⁹¹⁻⁹³ Neuere Studien zeigten signifikant erhöhte suPAR-Serumkonzentrationen bei Individuen mit symptomatischen Stenosen der Arteria carotis, bzw. erhöhten Laborwerten für C-reaktives Protein (CRP), sowie bei „*slow coronary flow*“ Phänomen (verzögerte Kontrastmitteldarstellung von Koronararterien ohne relevante Stenosen).^{94, 95}

1.3 Zielstellung der Arbeit

Das Ziel der im Folgenden dargestellten Arbeiten war es, spezifische intrazelluläre Signaltransduktionswege in glatten Gefäßmuskelzellen im Kontext der Atheroskleroseentstehung aufzuklären und sowohl deren Relevanz als auch mögliche therapeutische Ansatzpunkte zu erforschen. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Regulation von Zellmigrations- und Proliferationsprozessen durch das fibrinolytische System, insbesondere der Serinprotease Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und ihrem spezifischen Rezeptor, dem uPAR. Dabei wurde zusätzlich der Einfluss von Zell-Zell-Interaktionen zwischen Monozyten und VSMC mit Fokus auf deren Signaltransduktion und konsekutiven phänotypischen Veränderungen untersucht. Darüber hinaus wurden die Studien über grundlegende molekulare Signalmechanismen, die während pathologischer Remodellingprozesse für phänotypische Zellveränderungen im vaskulären System verantwortlich sind, auf molekulare Adaptationsmechanismen am Herzen und in Kardiomyozyten übertragen. In diesem Zusammenhang wurde auch auf eine geschlechtsspezifische Aktivierung von Signalwegen, insbesondere in der Aktivierung der beiden *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) - Komplexe und funktioneller Konsequenzen eingegangen.

2. Eigene Arbeiten

2.1 Urokinase stimuliert Migration glatter Gefäßmuskelzellen durch eine Interaktion der Phosphatidylinositol-3-Kinase mit Tyk2

Ausgangspunkt dieser Studie über intrazelluläre Signaltransduktionswege des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptors (uPAR) waren eigene Vorarbeiten in glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen, die auf eine Beteiligung von Januskinasen und STAT-Proteinen hinwiesen.^{96, 97} Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit

Kusch A, Tkachuk S, Haller H, Dietz R, Gulba DC, Lipp M, Dumler I.

Urokinase stimulates human vascular smooth muscle cell migration via a phosphatidylinositol 3-kinase-Tyk2 interaction.

J Biol Chem. 2000 Dec 15;275(50):39466-39473.

DOI: 10.1074/jbc.M003626200.

Verfügbar über: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)55887-2/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)55887-2/fulltext)

„Die Januskinasen Jak1 und Tyk2 spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivators (uPA). Wir haben vor kurzem gezeigt, dass beide Kinasen in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) mit dem uPA-Rezeptor (uPAR) assoziiert sind und die uPA-induzierte Aktivierung von Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STAT1, STAT2 und STAT4) vermitteln. Januskinasen werden nicht nur für die Aktivierung von STAT-Proteinen benötigt, sondern können auch in andere intrazelluläre Signalwege eingreifen. Hier zeigen wir auf, dass in VSMC Tyk2 mit einer nachgeschalteten Signalkaskade interagiert, an der die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) beteiligt ist. Wir zeigen, dass uPA eine Aktivierung der PI3-K induziert, was in VSMC, die eine dominant negative Form von Tyk2 exprimieren, aufgehoben ist. Die regulatorische Untereinheit p85 der PI3-K ko-immunpräzipitiert mit Tyk2, nicht jedoch mit Jak1, Jak2 oder Jak3, und uPA-Stimulation erhöht die PI3-K-Aktivität in Tyk2-Immünpräzipitaten. Tyk2 bindet uPA-abhängig direkt an eine der beiden Src homologen 2 (SH2) p85 Domänen. Wir belegen, dass die Tyk2-vermittelte Aktivierung der PI3-K durch uPA für die Migration VSMC erforderlich ist. Folglich verhinderten zwei unabhängige, strukturell unterschiedliche spezifische Inhibitoren der PI3-K, Wortmannin und LY294002, die durch uPA induzierte VSMC Migration. Es wurde kein Effekt auf die uPA-vermittelte Migration in VSMC beobachtet, die eine dominant negative Form von Tyk2 exprimierten. Unsere Ergebnisse unterstreichen die vielseitige Funktion von Tyk2 in der

uPA-abhängigen intrazellulären Signalvermittlung und zeigen, dass die PI3-K eine selektive Rolle in der Regulation der Migration von VSMC spielt.“ Übersetzung durch die Autorin.

Platzhalter:

Kusch A, Tkachuk S, Haller H, Dietz R, Gulba DC, Lipp M, Dumler I.

Urokinase stimulates human vascular smooth muscle cell migration via a phosphatidylinositol 3-kinase-Tyk2 interaction.

J Biol Chem. 2000 Dec 15;275(50):39466-39473.

Verfügbar über: <https://doi.org/10.1074/jbc.M003626200>.

2.2 Von Monozyten freigesetzte Urokinase hemmt das Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen durch Aktivierung von STAT1

In der vorangegangenen Arbeit wurden die Rolle des uPA/uPAR-Systems und die damit verbundene intrazelluläre Signaltransduktion für die Regulation der Migration von VSMC näher aufgeklärt.⁹⁸ Bei der Entwicklung einer vaskulären Intimahypertrophie in der Pathogenese der Atherosklerose sind jedoch auch Monozyten zentral beteiligt, die an der Stelle der Gefäßverletzung in direkten Kontakt mit den VSMC kommen.²² In nachfolgenden eigenen Studien wurde daher die Bedeutung der Monozyten-VSMC-Interaktion auf Veränderungen des funktionellen Verhaltens von VSMC weiter untersucht. Wir konnten zeigen, dass eine Kokultur von primären humanen koronaren VSMC mit frisch aus dem peripheren Blut gesunder Spender isolierter Monozyten zu einer gesteigerten Motilität der VSMC führt. Dies wird dabei durch monozytär freigesetztes uPA und auf den VSMC exprimierten uPAR vermittelt.⁹⁹

Diese Ergebnisse stimulierten die folgende Studie, die näheren zugrundeliegenden Signalmechanismen für die Aktivierung der VSMC weiter aufzuklären. Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit

Kunigal S, **Kusch A**, Tkachuk N, Tkachuk S, Jerke U, Haller H, Dumler I.

Monocyte-expressed urokinase inhibits vascular smooth muscle cell growth by activating Stat1. *Blood*. 2003 Dec 15;102(13):4377-4383.

Verfügbar über: <https://doi.org/10.1182/blood-2002-12-3872>

DOI: 10.1182/blood-2002-12-3872.

„Nach Gefäßverletzung kommt es zu einem Remodellingprozess, der durch die Migration und Infiltration von Leukozyten gekennzeichnet ist. Der Verlust der endothelialen Integrität ermöglicht es den Leukozyten mit glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) zu interagieren und „Marschbefehle“ zu geben; jedoch sind die Signalprozesse wenig verstanden. Wir fanden, dass humane Monozyten die Proliferation von VSMC hemmen und ein Migrationspotenzial induzieren. Die Monozyten vermitteln ihre Signale an die VSMC durch den Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA). Der uPA-Rezeptor (uPAR) der VSMC erhält das Signal und aktiviert den Transkriptionsfaktor STAT1, was seinerseits wieder antiproliferative Effekte auslöst. Diese Ergebnisse sind der erste Nachweis dafür, dass Monozyten Signale an VSMC senden, an denen das fibrinolytische System beteiligt ist und lassen auf eine wichtige Verbindung zwischen der uPA/uPAR-abhängigen Signalmaschinerie und humanen Gefäß-erkrankungen schließen.“ Übersetzung durch die Autorin.

Platzhalter:

Kunigal S, **Kusch A**, Tkachuk N, Tkachuk S, Jerke U, Haller H, Dumler I.
Monocyte-expressed urokinase inhibits vascular smooth muscle cell growth by
activating Stat1. Blood. 2003 Dec 15;102(13):4377-4383.
Verfügbar über: <https://doi.org/10.1182/blood-2002-12-3872>

2.3 Das Tight Junction Protein ZO-2 steuert die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen über eine Regulation von STAT1

Ziel der folgenden Arbeit war es, zusätzliche Regulationsmechanismen der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen zu identifizieren und zu charakterisieren. Ausgangspunkt waren u.a. frühere Arbeiten von Adams et al, die in einer systematischen Analyse von Genen in kultivierten VSMC-Subtypen das Tight Junction Gen *Zonula occludens 2* als Marker für VSMC und Mitspieler bei der Neointimabildung identifizierten.¹⁰⁰ Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit

Kusch A, Tkachuk S, Tkachuk N, Patecki M, Park JK, Dietz R, Haller H, Dumler I.

The tight junction protein ZO-2 mediates proliferation of vascular smooth muscle cells via regulation of Stat1.

Cardiovasc Res. 2009 Jul 1;83(1):115-122.

Verfügbar über: <https://academic.oup.com/cardiovasres/article/83/1/115/312833>

DOI: 10.1093/cvr/cvp117.

„**Ziele** Neuere Erkenntnisse legen es nahe, dass das *Zonula occludens* Protein 2 (ZO-2) über die Regulation von parazellulärer Permeabilität von Epithel- und Endothelzellen hinaus zusätzliche zelluläre Funktionen haben könnte. Die Deregulation von ZO-2 nach Ischämie, hypertonem Stress und vaskulären Verletzungen weist auf seine Rolle bei kardiovaskulären Störungen hin, am ehesten durch eine Regulation des funktionellen Verhaltens glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC). Die Rolle von ZO-2 in der Biologie der VSMC muss jedoch noch nachgewiesen werden. Unser Studiendesign war daraufhin ausgerichtet, die spezifischen Funktionen von ZO-2 in humanen VSMC zu verstehen.

Methoden und Ergebnisse Die Expression von ZO-2 und STAT1 nach Gefäßverletzung wurden in einem *ex vivo* Organkulturmodell von Koronararterien kombiniert mit immunhistochemischen Methoden untersucht. Die Suppression der ZO-2-Expression wurde mittels lentiviralem Gentransfer erzielt. Die Zellproliferation wurde durch Analyse der DNA-Synthese und durch Zellzählungen bestimmt. Die STAT1-Expression wurde mithilfe von Immunblots, Immunzytochemie, TaqMan und Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. Die funktionelle Bedeutung der Hochregulation von STAT1 wurde mithilfe eines STAT1-Promotor-Luziferaseassays und intrazellulärer Mikroinjektionen von STAT1-spezifischen Antikörpern untersucht. ZO-2 war in der Media und Neointima von dilatierten, aber nicht bei Kontrollarterien hoch exprimiert, wohingegen die Expression von STAT1 nach

Gefäßverletzung umgekehrt reguliert war. Die Analyse von VSMC mit unterdrückter ZO-2-Expression zeigte eine erhöhte Expression von STAT1 in diesen Zellen, wohingegen die Phosphorylierung von STAT1 nicht verändert war. Die STAT1-Hochregulation in VSMC mit supprimierter ZO-2-Genexpression führte zu einer koordinierten Aktivierung von STAT1-spezifischen Genen und infolgedessen zur Hemmung der Zellproliferation. Dieser Effekt konnte durch Mikroinjektion von STAT1- neutralisierenden Antikörpern wiederhergestellt werden.

Schlussfolgerung Unsere Daten legen es nahe, dass das Tight Junction Protein ZO-2 an der Regulation der Wachstumskontrolle von VSMC beteiligt ist und diese über den Transkriptionsfaktor STAT1 vermittelt wird. Unsere Ergebnisse weisen auf eine neue Funktion von ZO-2 in VSMC hin und implizieren ZO-2 als eine neue wichtige molekulare Zielstruktur in pathologischen Stadien vaskulären Remodellings bei kardiovaskulären Erkrankungen.“
Übersetzung durch die Autorin.

Platzhalter:

Kusch A, Tkachuk S, Tkachuk N, Patecki M, Park JK, Dietz R, Haller H, Dumler I. The tight junction protein ZO-2 mediates proliferation of vascular smooth muscle cells via regulation of Stat1.

Cardiovasc Res. 2009 Jul 1;83(1):115-122.

Verfügbar über: <https://doi.org/0.1093/cvr/cvp117>.

2.4 Rosuvastatin reguliert die phänotypische Modulation glatter Gefäßmuskelzellen beim vaskulären Remodelling: Rolle für den Urokinaserezeptor

Angesichts der pathogenetischen Rolle des uPAR bei der Atherosklerose sollte in der folgenden Arbeit die Frage geklärt werden, inwieweit die uPAR-Expression und -Funktion im Kontext der VSMC-Aktivierung nach Gefäßverletzung pharmakologisch beeinflussbar sind und wie sich das auf das Gefäßremodelling auswirkt. Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit

Kiyan* J, **Kusch* A**, Tkachuk S, Kramer J, Haller H, Dietz R, Smith G, Dumler I.

Rosuvastatin regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in vascular remodeling: role for the urokinase receptor.

Atherosclerosis. 2007 Dec;195(2):254-261.

Verfügbar über:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021915007000263?via%3Dihub>

DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.12.030.

*geteilte Erstautorschaft

„Das multifunktionale System des Urokinase (uPA)/Urokinaserezeptors (uPAR) ist ein wichtiger Vermittler von Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC). Ob jedoch uPA/uPAR-gesteuerte Mechanismen an den vorteilhaften Effekten von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Reduktasehemmern auf vaskuläre Umbauprozesse beteiligt sind, war bisher unbekannt. In dieser Studie haben wir den Effekt des hydrophilen Statins Rosuvastatin und die Rolle des uPAR auf neointimales Remodelling untersucht. Mithilfe eines *ex vivo* Organ- und *in vivo* Zellkulturmodellen zeigen wir, dass Rosuvastatin verletzungsbedingte Neointimabildung und Proliferation von VSMC der Media in Schweinekoronararterien reduziert, sowie auch Migration und Proliferation humaner koronarer VSMC. Experimente hinsichtlich der zugrundeliegenden Mechanismen zeigen, dass Rosuvastatin die Veränderung von VSMC von ihrem physiologischen kontraktilem in den pathophysiologischen Phänotyp beeinträchtigt. Diese Effekte werden zumindest teilweise durch den uPAR vermittelt, wie mithilfe von Rosuvastatin-induzierter uPAR-Expression und Suppression der uPAR-Genexpression in beiden Modellen bestätigt wurde. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Rosuvastatin phänotypische Veränderungen der VSMC moduliert und nachfolgend deren Proliferation und Migration und weisen auf die wichtige Rolle des uPAR bei diesen Prozessen hin. Dieser Mechanismus trägt zu dem vorteilhaften, nicht fettensenkenden

Effekt von Rosuvastatin auf ein negatives vaskuläres Remodelling bei.“ Übersetzung durch die Autorin.

Platzhalter:

Kiyan* J, **Kusch* A**, Tkachuk S, Kramer J, Haller H, Dietz R, Smith G, Dumler I. Rosuvastatin regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in vascular remodeling: role for the urokinase receptor.

Atherosclerosis. 2007 Dec;195(2):254-261.

Verfügbar über:

<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.12.030>.

*geteilte Erstautorschaft

2.5 17 β -Estradiol reguliert die Sensitivität von mTORC2 für Rapamycin beim adaptiven kardialen Remodelling

Ein weiterer zentraler Signalweg phänotypischer Veränderungen von VSMC ist der *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) Signalweg.¹⁰¹ Wir konnten in einer eigenen Arbeit zeigen, dass dieser Signalweg die VSMC-Differenzierung in den kontraktilen Phänotyp aus mesenchymalen Progenitorzellen (MSC) reguliert.¹⁰² Interessant ist bei diesem Signalweg, dass er geschlechtsspezifisch eine unterschiedliche Aktivität und Regulation aufweist. In einem Mausmodell fanden wir intrinsisch erhöhte Aktivitäten von mTOR Komplex 1 (mTORC1) und mTOR Komplex 2 (mTORC2) in weiblichen Herzen. Unter Mineralokortikoid-induzierten Stressbedingungen, die zur Ausbildung einer Myokardhypertrophie führten, führte eine mTOR-Inhibition mittels Rapamycin bei den männlichen Tieren zu einem vorteilhaften Rückgang der Hypertrophie, wohingegen die weiblichen Tiere eine dilatative Kardiomyopathie entwickelten, die durch eine reduzierte mTORC2 –Aktivität und verminderte Expression des Östrogenrezeptors β (ER β) charakterisiert war.¹⁰³ Das weist darauf hin, dass ein genaueres Verständnis von adaptiven und maladaptiven intrazellulären Regulationsmechanismen nicht nur für molekulare Therapieansätze bei vaskulären Erkrankungen, wie der Atherosklerose essentiell, sondern auch für neue Therapieansätze oder dem Verständnis unerwünschter Wirkungen von bereits zugelassenen Medikamenten ist. Dabei sollten zusätzlich geschlechtsspezifische Faktoren und unterschiedliche Empfindlichkeiten für bestimmte Noxen, bzw. Reaktionsweisen von Frauen und Männern berücksichtigt werden.^{104, 105} In der nachfolgenden Arbeit führten wir zusätzliche mechanistische Untersuchungen an Kardiomyozyten durch, um die oben beschriebene, geschlechtsspezifische Auswirkung der mTOR-Signalweg-Inhibition mittels Rapamycin weiter aufzuklären. Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit

Kusch A, Schmidt M, Gurgun D, Postpieszala D, Catar R, Hegner B, Davidson MM, Mahmoodzadeh S, Dragun D.

17 β -Estradiol regulates mTORC2 sensitivity to rapamycin in adaptive cardiac remodeling.

PLoS One, 2015 10(4):e0123385.

Verfügbar über: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0123385>

DOI: 10.1371/journal.pone.0123385

„Adaptives kardiales Remodelling ist durch eine erhöhte Signalvermittlung der mTORC2 nachgeschalteten Proteinkinase B (Akt) charakterisiert. Bei Frauen tragen sowohl 17 β -Estradiol (E₂), als auch Akt wesentlich zur geschlechtsabhängigen prämenopausalen Kardioprotektion

bei. Pharmakologische Therapien mit Rapamycin, die gegen mTOR gerichtet sind, werden zunehmend bei verschiedenen klinischen Indikationen eingesetzt, verbunden jedoch mit einem klinisch heterogenen therapeutischen Ansprechen. Das Arzneimittel hemmt mTORC1 und in geringerem Ausmaß mTORC2. In männlichen Nagern vermindert Rapamycin maladaptive kardiale Hypertrophie, wohingegen es zu schwerwiegender dilatativer Kardiomyopathie bei den Weibchen führt. Wir vermuteten, dass die mTOR-Inhibition mit 17 β -Estradiol (E2)-vermitteltem sexuellen Dimorphismus und adaptivem Zellwachstum interferieren könnte und untersuchten Auswirkungen in weiblichen Mauserzen und kultivierten weiblichen Kardiomyozyten. Unter physiologischen *in vivo* Bedingungen beeinträchtigte Rapamycin die mTORC2-Funktion nur in Herzen von weiblichen, nicht aber von männlichen Mäusen. In kultivierten weiblichen Kardiomyozyten hemmte Rapamycin gleichzeitig die IGF-1-induzierte Aktivierung beider mTOR-Signalzweige, mTORC1 und mTORC2, jedoch nur in Gegenwart von E2. Der Einsatz spezifischer Östrogenrezeptor (ER) α - und ER β -Agonisten deutete auf eine Beteiligung beider Östrogenrezeptoren (ER) an den Rapamycineffekten auf mTORC1 und mTORC2 hin. Klassische Feedbackmechanismen, wie sie häufig in Tumorzellen mit einer Hochregulierung des PI3-K-Signalweges beobachtet werden, spielten hier keine Rolle. Der E2-Effekt von Rapamycin auf die Reduktion der Akt-Phosphorylierung an Ser473 war unabhängig von ERK, wie sequentielle mTOR- und *Mitogen-activated protein kinase kinase* (MEK) - Inhibitionen zeigten. Darüber hinaus kam es zu keiner Veränderung der Phosphorylierung von *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (Rictor) an Ser1235, die bekanntermaßen die Akt-Substratbindung an mTORC2 hemmt. Funktionell reduzierte Rapamycin signifikant den trophischen Effekt von E2 auf die Zellgröße. Zusätzlich zeigten Kardiomyozyten mit reduzierter Akt-pS473 unter Rapamycinbehandlung eine verminderte mRNA und Proteinexpression für *Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2A* (Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums, SERCA2A), was eine negative Auswirkung auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten nahelegt. Die Unterdrückung der Rictor-Genexpression bestätigte die Regulation der SERCA2A Expression durch mTORC2 in mit E2 kultivierten weiblichen Kardiomyozyten. Diese Daten stellen sowohl eine neue modulatorische Funktion von E2 auf die Auswirkungen von Rapamycin auf mTORC2 in weiblichen Kardiomyozyten dar als auch eine Regulation der Expression der SERCA2 durch mTORC2. Vermutlich verhindert Rapamycin den prämenopausalen „Frauenvorteil“.“ Übersetzung durch die Autorin.

Platzhalter:

Kusch A, Schmidt M, Gurgun D, Postpieszala D, Catar R, Hegner B, Davidson MM, Mahmoodzadeh S, Dragun D.

17 β -Estradiol regulates mTORC2 sensitivity to rapamycin in adaptive cardiac remodeling.

PLoS One, 2015 10(4):e0123385.

Verfügbar über: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123385>

3. Diskussion

In den hier zusammengefassten Arbeiten wurden, basierend auf zum Teil eigenen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe molekulare Signaltransduktionsmechanismen, die phänotypische und funktionelle Veränderungen der VSMC im Kontext der Atherogenese induzieren, weiter untersucht. Dabei wurden neue, relevante Zell-Zell-Interaktionen zwischen Monozyten und VSMC aufgeklärt, die über das Urokinase-/Urokinaserezeptorsystem vermittelt werden. Die Arbeiten beleuchten dabei relevante, nicht-proteolytische Funktionen dieser Komponenten des Fibrinolyse-Systems. Mithilfe von Zellkulturmodellen mit Mono- und Kokulturen primärer humaner koronarer VSMC und primärer humaner Monozyten, *ex vivo* Organmodellen, Zelltransfer aus einem genetischen Mausmodell und pharmakologischer Intervention wurden translationale Aspekte der neu identifizierten Signalwege adressiert und therapeutische Implikationen aufgezeigt. Die Studien wurden in der Folge von Erkenntnissen der Regulation phänotypischer Veränderungen von Zellen des vaskulären Systems im Rahmen pathologischer Remodellingprozesse auf molekulare Adaptationsmechanismen am Herzen und in Kardiomyozyten erweitert.

Molekulare Mechanismen der Zellmigration von VSMC – Rolle von Januskinasen und PI3-K-Signalweg

Januskinasen sind ein klassischer intrazellulärer Signalweg von Zytokinen, um Zellen in einem inflammatorischen Milieu zu aktivieren. Sie gehören zur Familie der intrazellulären Nicht-Rezeptortyrosinkinase und haben vier Mitglieder: Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2. Der Name kommt von „*just another kinase*“. bzw. dem doppelgesichtigen römischen Gott „Janus“ aufgrund ihrer zwei, fast identischen phosphattransferierenden Domänen, von denen die eine Kinaseaktivität besitzt und die andere diese negativ reguliert.¹⁰⁶ Frühe experimentelle Arbeiten in Apolipoprotein E defizienten (ApoE^{-/-}) Mäusen haben gezeigt, dass pharmakologische Hemmung von Jak2 mit Tyrphostin AG490 Atherosklerose reduziert.¹⁰⁷ Darüber hinaus waren Ausgangspunkt unserer Studien zur Beteiligung von Januskinasen an der Signaltransduktion und funktionellen Auswirkungen von uPA/uPAR in VSMC eigene Befunde in Endothelzellen und VSMC, die eine Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges durch uPA gezeigt hatten.^{96, 97} Zudem gab es tierexperimentelle Studien, die eine pathogenetische Rolle von Urokinase bei der Ausbildung einer Neointima nachgewiesen hatten.^{108, 109} Die Migration VSMC gehört zu den fundamentalen pathogenetischen Mechanismen der Atherosklerose.⁵⁸ Unsere Arbeiten lieferten den ersten Nachweis, dass es in primären humanen Koronararterien nach uPA-Stimulation zu

einer Assoziation von Tyk2 mit der PI3-K kommt, die zu einer Reorganisation des Zytoskeletts und gesteigerten Migration von VSMC führt.⁹⁸

Es war bereits zuvor bekannt, dass uPA/uPAR Zellmotilität steigern kann. Allerdings scheinen die intrazellulären Mechanismen sehr zellspezifisch zu sein. Z.B. waren in Brustkrebs- und Fibrosarkomzellen das kleine G-Protein und Proto-Onkogen *Rat sarcoma* Protein (RAS), *Mitogen-activated protein kinase kinase* (Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase, MEK), *Extracellular regulated kinase* (extrazellulär regulierte Kinase, ERK) und *Myosin light chain kinase* (Myosin-Leichtkettenkinase, MLCK) nachfolgende Effektoren, in Epithelzellen die Proteinkinase C und in monozytären Zellen die Src-Kinasen (Nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen, erstmalig als Gen-Produkt des *v-src* (virales src) des Rous-Sarkom-Virus beschrieben). Auch Integrine und G-Proteine sind an der uPA/uPAR-vermittelten Zellmigration beteiligt.^{75, 110}

Neben dieser Spezifität der Januskinasenbeteiligung an der uPA-induzierten VSMC-Migration ist auch die Tatsache bemerkenswert, dass nur Tyk2 und nicht andere Januskinasen, wie für z.B. Jak1 in Kardiomyozyten, Jak2 in Neutrophilen und Jak3 in humanen T-Zellen beschrieben, mit der PI3-K nach uPA-Stimulation assoziierten.⁹⁸ Auch PDGF kann eine Zunahme der VSMC-Migration induzieren. Diese wird über Aktivierungen von Jak2/STAT3, aber auch weiterer Signalkaskaden über *focal adhesion kinase* (fokale Adhäsionskinase, FAK), *mitogen-activated protein kinase* (Mitogen aktivierte Proteinkinase, MAPK), und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase/ *reactive oxygen species* (reaktive Sauerstoffspezies, ROS)/ *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFκB)/ mTOR/ p70S6 Kinase vermittelt.¹¹¹⁻¹¹⁴

Viele neuere Studien adressierten den therapeutischen Einsatz von Januskinase-Inhibitoren v.a. aufgrund der anti-inflammatorischen und immunsystemmodulierenden Effekte. Aktuelle Arbeiten im Rahmen der COVID-19 Pandemie konnten die Januskinasen als eine effektive Zielstruktur für die Therapie des Zytokinsturms in der frühen inflammatorischen Phase der COVID-19 Erkrankungen identifizieren.^{115, 116} Weitere klinische Einsatzfelder von Jak-Inhibitoren sind u.a. Tumorerkrankungen, entzündliche Darmerkrankungen, Psoriasis, rheumatoide Arthritis, neuroinflammatorische und Autoimmunerkrankungen.¹¹⁷⁻¹²¹ Die Entwicklungen und Studien mit Tyk2-Inhibitoren sind noch nicht so weit fortgeschritten wie mit Inhibitoren für die anderen Januskinasen. Erste Hinweise finden sich für einen möglichen therapeutischen Einsatz von Tyk2 Inhibitoren bei Psoriasis, Colitis ulcerosa, rheumatoide Arthritis und ankylosierender Spondyloarthritis.¹²² Im kardiovaskulären System sind multiple experimentelle und präklinische Studien mit Jak-Inhibitoren zur molekularen Therapie von

negativem Remodelling der Pulmonalarterien bei arterieller Hypertonie, wie auch Aortenklappenverkalkungen im Gange.^{123, 124} Eine neuere Übersichtsstudie beschäftigte sich mit den klinischen Auswirkungen von Jak-Inhibitoren auf das kardiovaskuläre System, insbesondere der Herzfunktion, Progression der Atherosklerose, Veränderungen des Lipidprofils und thromboembolischen Komplikationen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. Während sich in diesen Analysen positive Auswirkungen auf das Lipidprofil und kardiovaskuläre Risiko abzeichneten, fanden sich widersprüchliche Effekte bezogen auf thromboembolische Komplikationen.¹¹⁷ Allerdings wurde vor kurzem in einem Rote-Hand-Brief eine Warnung vor erhöhtem Risiko für schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse und Krebserkrankungen für den Jak1/Jak3-Inhibitor Tofacitinib ausgesprochen, so dass abschließende Bewertungen noch abgewartet werden müssen.¹²⁵

Die Aktivierung der PI3-K ist zentral an Migrationsprozessen, induziert durch Zytokine und Wachstumsfaktoren, nicht nur von VSMC, sondern auch anderer Zelltypen beteiligt.¹²⁶ Dabei vermittelt dieser Signalweg auch zusätzliche Mechanismen, die für eine Zellinvasion erforderlich sind, wie Chemotaxis und Remodelling der extrazellulären Matrix, z.B. durch verstärkte Expression von Matrixmetalloproteinasen, wie z.B. der Matrixmetalloproteinase 9 (MMP-9).¹²⁷ Darüber hinaus reguliert die PI3-K in VSMC auch Proliferation, osteogene Differenzierung, wie auch die Schaumzellbildung durch IGF-1 und Akt. Allerdings sind die Funktionen der PI3-K je nach Zelltyp und Stadium der Atherosklerose häufig divergent bezüglich protektiver oder progressiver Effekte, dass spezifische Signalkaskaden selektiv durch Pharmaka moduliert werden müssten. Nicht zuletzt deshalb finden sich derzeit präklinische Studien mit PI3-K-Inhibitoren eher bei Tumorerkrankungen, die mit einer Akt-/PI3-K-Überaktivierung einhergehen, als bei der Atherosklerosetherapie.¹²⁶

Regulation des Wachstums VSMC in verschiedenen Phasen der Atherogenese

Unter physiologischen Bedingungen haben VSMC eine sehr geringe Proliferationsrate. Nach Gefäßverletzung wurden in vielen experimentellen Modellen erhöhte Proliferationsraten beschrieben, während in Läsionen beim Menschen häufig wenig proliferierende VSMC entdeckt wurden. Auch in experimentellen fortgeschrittenen Plaques überwiegen geringe Proliferationsraten mit reduzierter Expression von Transkriptionsfaktoren und erhöhter Expression von Zellzyklusinhibitoren, sowie Marker für vaskuläre Seneszenz.⁴³ Wir hatten zuvor in einem Ko-Kulturmodell von primären humanen koronaren VSMC mit humanen Monozyten beschrieben, dass diese zu einer erhöhten Motilität von VSMC durch monozytär

freigesetzte uPA vermittelt über den uPAR auf den VSMC führten. Die Proliferationsrate der VSMC war dabei unverändert geblieben.⁹⁹ Selbst unter Zellkulturbedingungen mit Serum fand sich dieser Proliferationsstop in den VSMC.¹²⁸ Die Proliferationshemmung wurde durch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1 vermittelt, der in ko-kultivierten VSMC im Vergleich zu mono-kultivierten VSMC resistent gegenüber IFN- γ -induzierter STAT1-Aktivierung war.¹²⁸ Diese Befunde legen es nahe, dass in der Frühphase der Atherogenese Mechanismen aktiviert werden, die zu einer erhöhten Migration der VSMC führen bei gleichzeitiger Hemmung der Proliferation und primär durch das Remodelling der Matrix vorteilhafte Reparaturmechanismen induzieren. Beim Menschen ist es weiterhin ungeklärt, ob die VSMC-Migration abhängig oder unabhängig von Proliferation ist.⁴³ Welches STAT-Protein dabei aktiviert wird, ist sehr spezifisch abhängig vom Aktivator, im Einzelnen Zytokine, Wachstumsfaktoren oder andere lösliche Proteine. Interessanterweise zählt im Immunsystem die STAT1-Aktivierung als „zellintrinsisches anti-Tumorsignal“ und ist ein wichtiger „zellextrinsischer Mediator der Immunsurveillance“.^{129, 130}

Neben der uPA/uPAR-vermittelten Aktivierung von STAT1 konnten wir einen weiteren Regulationsmechanismus in VSMC aufklären, der an der Proliferationshemmung beteiligt ist.¹³¹ Genanalysen hatten eine anhaltende und hohe Expression des Tight Junction-Proteins ZO-2 nach Gefäßverletzung beschrieben.¹⁰⁰ Tight Junction-Proteine sind nicht nur an der Regulation von parazellulärer Permeabilität und Leukozytentransmigration beteiligt, sondern können auch durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der *activator protein 1* (AP-1) - Familie, wie die Protoonkogenprodukte c-Jun und c-Fos, sowie *CCAAT-enhancer-binding proteins* (C/EBP) Genexpression verändern und Zelldifferenzierung und Zelltransformation induzieren.^{131, 132}

In einem *ex vivo* Organmodell fanden wir in dilatierten Gefäßabschnitten eine erhöhte Expression von ZO-2 und konnten einen direkten Einfluss dieses Proteins auf die STAT1-Aktivierung in den VSMC nachweisen.¹³¹

Wingless and Int-1 (Wnt) -Signaltransduktion und TGF- β /*signal transducer and transcriptional modulator family member 3* (SMAD3) sind weitere relevante Mechanismen der Regulation der VSMC-Proliferation im atherosklerotischen Plaque.¹³³ Ähnlich wie bei der Aktivierung der PI3-K kann auch hier TGF- β sowohl pro- als auch anti-atherogene Effekte auslösen. Bemerkenswert sind durch diesen Wachstumsfaktor differenziell induzierte microRNA, die spezifischere therapeutische Zielstrukturen darstellen könnten.¹³⁴ Bei Patienten

mit Diabetes mellitus erscheinen zusätzliche Transkriptionsfaktoren relevant für die Migration, Proliferation und phänotypischen Veränderungen von VSMC. Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und höhere Konzentrationen von „advanced glycation end products“ führen zu einer erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors *nuclear factor of activated T cell 1* (NFATc1) in VSMC verbunden mit einer Steigerung von Migration und Proliferation.¹³⁵

Regulation des VSMC Phänotyps während der Atherogenese

Neue Studien mit *in vivo*-Verfolgung der genetischen Abstammung von VSMC kombiniert mit Einzelzellsequenzierung haben heterogene Transkriptome von VSMC in atherosklerotischen Läsionen aufgezeigt. Zudem legen genetische Tiermodelle eine wichtige Rolle VSMC-assoziiierter Gene in der Atherogenese nahe.¹³⁶⁻¹³⁹ VSMC können vom kontraktilen Phänotyp in verschiedene Zelltypen entdifferenzieren, wie z.B. Schaumzellen, Fibromyozyten, inflammatorische oder osteogene Zellen, die entweder das Fortschreiten der atherosklerotischen Läsion begrenzen oder fördern.⁵⁷

Wir konnten zeigen, dass der uPAR pathogenetisch an der Veränderung von VSMC vom kontraktilen hin zum entdifferenzierten Typ und der Ausbildung einer Neointima beteiligt ist.¹⁴⁰ VSMC in atherosklerotischen Läsionen weisen eine erhöhte Expression des uPAR auf.⁷³ Ein *knock-out* des uPAR in VSMC oder pharmakologische Suppression des uPAR durch den Einsatz des Statins Rosuvastatin führten in einem *ex vivo* Organmodell mit Gefäßverletzung durch Dilatation zu einer erhöhten Expression kontraktiler Proteine und entsprechender Veränderungen des Zytoskeletts, sowie Prävention negativen vaskulären Remodellings.¹⁴⁰ Hiermit wurde erstmalig neben deren Einfluss auf den Lipidmetabolismus ein neuer pleiotroper Effekt von Statinen beschrieben, über eine Regulation von Komponenten des fibrinolytischen Systems Atherosklerose vorteilhaft zu beeinflussen. Spätere Arbeiten wiesen eine Reduktion der uPAR-Expression auch auf Endothelzellen nach Behandlung mit Simvastatin und Atorvastatin nach.¹⁴¹

Weitere pleiotrope Effekte von Statinen, die Genexpression von VSMC und konsekutiv deren funktionellen Status und Phänotyp zu verändern, beruhen u.a. auf deren Einfluss auf den NF- κ B-Signalweg mit Transkription pro- und anti-inflammatorischer Zytokine, der Reduktion von microRNA, wie z.B. miRNA 221/222, verminderter Expression von Komponenten des Wnt-Signalweges und des NOD-, LRR- und Pyridomäne-beinhaltenden Protein 3 (NLRP3) Inflammasoms, sowie Verbesserung lysosomaler Funktionen und Erhöhung der Zahl an

endothelialen Progenitorzellen.¹⁴² Mögliche zusätzliche indirekte Statin-Effekte auf Mechanismen der Genmodifikation von VSMC könnten ihr erst vor kurzem beschriebener Einfluss auf das Mikrobiomprofil und die Blutlipide darstellen.^{2, 143}

Die wichtigsten Transkriptionsfaktoren, die phänotypische Veränderungen in den VSMC induzieren, sind Myocardin, Krüppel-like factor 4 (KLF4) und Octamer-Bindungs-Transkriptionsfaktor (Oct4).^{144, 145}

Bereits geringe Konzentrationen von oxidiertem LDL (oxLDL) unterdrücken die Expression kontraktile Proteine und Myocardin in VSMC bei gleichzeitig erhöhter Expression von pro-inflammatorischen Molekülen. Der uPAR kann mit *Cluster of differentiation 36* (auch Plättchen-Glykoprotein 4 (CD36) und *Toll-like* Rezeptor 4 (TLR4) assoziieren und über NF- κ B Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) induzieren, was Makrophagen wiederum zur Produktion des Chemokins Monozyten-chemoattraktives Protein 1 (MCP-1) anregt.¹⁴⁶

Myocardin-verwandte Transkriptionsfaktoren A und B (MRTFs) haben Einfluss auf die Proliferationsrate über eine Regulation des Zellzyklus.¹⁴⁴ Auch aggregiertes LDL hat negative Auswirkungen auf den Erhalt des kontraktile Phänotyps der VSMC.¹⁴⁷

KLF4 führt nicht nur zur phänotypischen Veränderung VSMC in den entdifferenzierten Typ, Schaumzellbildung und Proliferation, sondern induziert auch in Makrophagen Polarisierung, Lymphozytendifferenzierung und fördert inflammatorische Prozesse in Endothelzellen.¹⁴⁸ Außerdem reguliert er die Differenzierung von VSMC zu osteogenen Zellen.¹³⁸

In fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen scheint Oct4 für den Erhalt der Plaque-Stabilität und Begrenzung der Ausdehnung der Läsion erforderlich zu sein.¹⁴⁹

Nicht nur die transkriptionelle Regulation ist bei der phänotypischen Modifikation von VSMC von essentieller Bedeutung. Auch epigenetische Mechanismen, wie Histonacetylierung in *serum response factor* (SRF) - Bindungsregionen und Methylierungen der Histone H3 und H4, wie auch microRNA und nichtkodierende RNAs tragen zu Phänotypänderungen der VSMC bei und stellen mögliche neue therapeutische Zielstrukturen dar.¹⁴⁴

Ein bedeutender intrazellulärer Signalweg, der VSMC-Differenzierung ist auch der mTOR-Signalweg.¹⁰¹ In eigenen Arbeiten konnten wir zeigen, dass die Hemmung dieses Signalwegs mit geringen Konzentrationen von Rapamycin, den kontraktile Phänotyp von VSMC stabilisiert.¹⁰² Darüber hinaus führt mTOR-Inhibition zu einer Steigerung von Autophagie mit erhöhter Plaquestabilität in mit Fett gefütterten ApoE^{-/-}-Mäusen.¹⁵⁰ Im Weiteren wird dadurch

eine Seneszenz von VSMC verhindert, die zu Plaqueinstabilitäten beiträgt. In diesem Sinne könnten Pharmaka, die gleichzeitig Autophagie steigern und Seneszenz hemmen, wie z.B. mTOR-Inhibitoren (mTORis), vaskuläres Remodelling positiv steuern.¹⁵¹ Allerdings muss dabei bedacht werden, dass der lokale oder systemische Einsatz dieser Substanzen auch relevante Heilungsprozesse behindert, wie z.B. eine verzögerte Reendothelialisierung bei Einsatz von *drug-eluting* Stents (DES) bei perkutanen Koronarinterventionen (PCI) zur Verhinderung von Restenosen gezeigt haben.¹⁵² Insgesamt aber überwiegen die positiven Effekte der DES und bieten sehr hohe klinische Effizienz und Sicherheit. Daher werden „*new-generation* DES“ (pharmakologische mTORis freisetzende Stents) in den europäischen Guidelines bei koronaren Interventionen empfohlen „*as the default stent type for PCI regardless of clinical presentation, lesion subtype, concomitant therapies or comorbidities.*“¹⁵³

Rolle des mTOR Signalwegs bei kardialem Remodelling

mTORis erscheinen nicht nur vorteilhaft in der Therapie atherosklerotischer Gefäßveränderungen, sondern können auch kardiale Remodellingprozesse günstig beeinflussen. Klinische Studien in Patienten nach Nieren- und Herztransplantation, die zur Immunsuppression mit mTORis behandelt wurden, zeigten eine Rückbildung der linksventrikulären Hypertrophie verbunden mit einer verbesserten linksventrikulären diastolischen Funktion und besserem kardiovaskulären Outcome.¹⁵⁴ Sie bestätigten damit frühere tierexperimentelle Arbeiten, die eine Wirksamkeit von mTORis nicht nur in der Verhinderung pathologischer Myokardhypertrophie unter Druckbelastung oder Ischämie gezeigt hatten, sondern auch in einer erfolgreichen Rückbildung bereits bestehendem pathologischen Remodelling.¹⁵⁵⁻¹⁵⁸

Die Kinase mTOR bildet zwei Komplexe, mTORC1 und mTORC2, über die sie unterschiedliche nachfolgende Signalmoleküle aktiviert und verschiedene Zellfunktionen reguliert, wie Zellwachstum, Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose.^{159,160} Klassische mTORis, wie z.B. Rapamycin und Everolimus, hemmen bevorzugt mTORC1 und nur in hohen Konzentrationen oder nach längerer Behandlung auch mTORC2.^{161,162}

Der mTOR-Signalweg steuert sowohl physiologische, adaptive Prozesse, als auch maladaptive Remodelling.¹⁶⁰ Im Herzen kommt es dabei z.B. unter körperlichen Belastungen zu einer Aktivierung des *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1)/PI3K/Akt/mTOR-Signalweges mit Ausbildung einer adaptiven Hypertrophie, die mit einer verbesserten Pumpleistung des Herzens einhergeht. Im Gegensatz dabei kommt es bei pathologischer Hypertrophie, wie z.B. durch

anhaltend erhöhter Druckbelastung bei arterieller Hypertonie, Aortenstenose, Ischämie oder urämischer Toxine zu einer verminderten Kontraktilität des Herzens mit Aktivierung anderer Signalwege, wie Stresskinasen und inflammatorischer Mechanismen, sowie einer Reaktivierung des fetalen Genprogramms.¹⁶³⁻¹⁶⁵

Besonders mTORC2, der die nachgeschaltete „pro-survival-Kinase“ Akt aktiviert, kommt nicht nur eine wachstumsfördernde Rolle bei der physiologischen Hypertrophie zu, sondern auch eine protektive nach ischämischem Myokardinfarkt. Für ein vorteilhaftes Remodelling ist dabei eine Hemmung von mTORC1 bei gleichzeitigem Erhalt oder Aktivierung von mTORC2 entscheidend.¹⁶⁶ mTORC2 kommt darüber hinaus auch eine wichtige Rolle bei kompensatorischen Mechanismen unter Druckbelastung des Herzens zu.¹⁶⁷

Bei diesen Remodellingprozessen kommen auch geschlechtsspezifische Aspekte zum Tragen. Dabei nimmt bei physiologischer Myokardhypertrophie der ER β eine entscheidende Rolle ein. Weibliche Mäuse entwickelten eine stärkere physiologische kardiale Hypertrophie durch Aktivierung des Akt-Signalweges, MAPK-Signalwege, Proteinsynthese und mitochondriale Adaptationsprozesse als männliche Mäuse. Genetische Deletion des ER β hob diese Geschlechtsunterschiede auf.¹⁶⁸

Eigene Arbeiten mit einem Mausmodell kardiorener Interaktion mit Mineralokortikoidexzess zeigten, dass Frauen vor der Entwicklung einer pathologischen Myokardhypertrophie geschützt waren und dieser Effekt nach Deletion des ER β verloren ging.¹⁶⁹

In weiteren Arbeiten mit diesem Mausmodell fanden wir geschlechtsspezifische Reaktionen nach Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin. Er reduzierte effektiv die Myokardhypertrophie in männlichen Tieren, wohingegen es bei den weiblichen Tieren zur Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie kam. Diese war verbunden mit einer Herunterregulation des ER β und unterschiedlicher Sensitivität beider mTOR-Komplexe hinsichtlich der Hemmung durch Rapamycin. Weibliche Tiere zeigten eine Hemmung sowohl von mTORC1, als auch mTORC2, wohingegen bei den männlichen Tieren die mTORC2-Aktivität nicht durch Rapamycin beeinflusst wurde.¹⁰³ Weitere eigene *in vitro* und *in vivo* Studien konnten den Pathomechanismus der verstärkten Empfindlichkeit von mTORC2 gegenüber Inhibition durch Rapamycin bei weiblichen Tieren näher aufklären. Es zeigte sich, dass die gleichzeitige Stimulation beider Östrogenrezeptoren (ER α und ER β) für die Hemmbarkeit von mTORC2 durch Rapamycin erforderlich ist. Dabei kam es zu einer verminderten Expression von SERCA2A auf mRNA und Proteinebene, was negative Konsequenzen für die Kontraktilität nahelegt.¹⁷⁰ Auch andere Arbeitsgruppen bestätigten geschlechtsspezifische Regulationen des

mTOR-Signalweges in einem Infarktmodell in Ratten.¹⁷¹ Weitere geschlechtsspezifische Effekte von Rapamycin wurden für das Proteasom/Chaperon-System und Immunregulation beschrieben.^{172, 173}

Anhand dieser Befunde und der relevanten Geschlechtsunterschiede in der Entwicklung und dem Verlauf kardiovaskulärer Erkrankungen¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ ist es dringend erforderlich, weitere klinische und experimentelle Studien unter Berücksichtigung dieser Aspekte durchzuführen.

4. Zusammenfassung

Kenntnisse über die molekularen pathogenetischen Mechanismen bilden die Grundlage neuer zielspezifischer Therapien und können wichtige Hinweise auf Wirkungen und unerwünschte Wirkungen liefern. Dabei sind die Vorgänge bei kardiovaskulären Remodellingvorgängen sehr komplex und umfassen nicht nur eine Vielfalt von Verknüpfungen intrazellulärer Signalkaskaden, sondern auch ein Wechselspiel zwischen unterschiedlichen Zelltypen, einer breiten Dynamik von Zelltransformationen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anderen Zellaktivatoren, sowie systemischen Regulationen durch Vesikel, Mikro- und Nichtkodierende RNA, genetischen Prädispositionen und epigenetischen Veränderungen. Experimentelle Arbeiten in diesem Bereich erfordern ein Fokussieren auf einzelne Aspekte, um grundlegende Interaktionen tiefergehend verstehen zu können.

Die vorliegenden Arbeiten haben wesentliche Aspekte zum Verständnis der molekularen Mechanismen des Urokinase-/Urokinaserezeptorsystems im Kontext der Atherogenese beigetragen. Erstmals konnte die Arbeitsgruppe zusätzlich zur bekannten Rolle von STAT-Proteinen bei der transkriptionellen Regulation VSMC die Beteiligung von Januskinasen und der PI3-K in der intrazellulären Signalvermittlung des uPAR nachweisen und deren Bedeutung für die Migration VSMC. Weitere Arbeiten deckten die Rolle monozytär exprimierter Urokinase an der uPA/uPAR-induzierten Wachstumshemmung von VSMC vermittelt durch STAT1 auf und beschrieben Auswirkungen von direktem und indirektem Kontakt von VSMC und Monozyten auf die Proliferationsrate von VSMC. Als zusätzlicher essentieller Faktor für die Regulation von STAT1, der in VSMC einen Proliferationsstop vermittelte, wurde das Tight Junction Protein ZO-2 identifiziert, das in atherosklerotischen Läsionen hochreguliert ist. Die Bedeutung dieses Proteins an transkriptionellen Regulationen, Signaltransduktion, Zelldifferenzierung und Morphogenese waren zwar bereits in anderen Zellen zusätzlich zum klassischen Einfluss auf die parazelluläre Permeabilität beschrieben worden, nicht jedoch in

VSMC. Eine Studie mit direkterer pharmakologisch translationaler Bedeutung waren die Untersuchungen des Statins Rosuvastatin auf die Regulation des uPA/uPAR-Systems und die funktionellen Konsequenzen bezüglich Neointimabildung. Wir konnten einen neuen pleiotropen Effekt dieses Statins in VSMC aufzeigen, der durch eine Herunterregulation des uPAR und damit verbundenen Erhalt des kontraktiven Phänotyps mit Hemmung von Migration und Proliferation gekennzeichnet war. Des Weiteren erfolgten Studien zur Rolle des mTOR-Signalweges bei der phänotypischen Modifikation VSMC und adaptiver und maladaptiver Remodellingprozesse am Herzen, die erstmalig auf die Bedeutung geschlechtsspezifischer Aspekte des mTOR-Signalweges hinwiesen und mechanistisch weiter aufklärten.

Die Erkenntnisse dieser Studien haben grundlegend zum Verständnis der nicht-fibrinolytischen Funktionen des uPA/uPAR-Systems, sowie der mTOR-Signaltransduktion bei kardiovaskulärem Remodelling mit der Bedeutung des Einflusses von Geschlecht und spezifischer Hormonrezeptoren beigetragen. Diese Arbeiten bekräftigen die Notwendigkeit, im heutigen Zeitalter der Präzisionsmedizin, Studien mit neuen molekularen Therapieansätzen immer auch unter Berücksichtigung von Geschlecht und Alter durchzuführen.

5. Literaturangaben

1. Tan CMJ, Lewandowski AJ. The Transitional Heart: From Early Embryonic and Fetal Development to Neonatal Life. *Fetal Diagn Ther.* 2020 47(5):373-386. DOI: 10.1159/000501906.
2. Barrington WT, Lusis AJ. Atherosclerosis: Association between the gut microbiome and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2017 Dec;14(12):699-700. DOI: 10.1038/nrcardio.2017.169.
3. Xu S, Pelisek J, Jin ZG. Atherosclerosis Is an Epigenetic Disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2018 Nov;29(11):739-742. DOI: 10.1016/j.tem.2018.04.007.
4. Kathiresan S, Srivastava D. Genetics of human cardiovascular disease. *Cell.* 2012 Mar 16;148(6):1242-1257. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.001.
5. Santos RD, Miname MH. Increased subclinical atherosclerosis burden in familial hypercholesterolemia phenotype: What do genetic defects tell us and what are the clinical implications? *Atherosclerosis.* 2017 Aug;263:316-317. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.004.
6. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, Hegele RA, Krauss RM, Raal FJ, Schunkert H, Watts GF, Boren J, Fazio S, Horton JD, Masana L, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, van de Sluis B, Taskiran MR, Tokgozlu L, Landmesser U, Laufs U, Wiklund O, Stock JK, Chapman MJ, Catapano AL. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2017 Aug 21;38(32):2459-2472. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx144.

7. Liu R, Leslie KL, Martin KA. Epigenetic regulation of smooth muscle cell plasticity. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Apr;1849(4):448-453. DOI: 10.1016/j.bbagr.2014.06.004.
8. Brown HL, Smith GN. Pregnancy Complications, Cardiovascular Risk Factors, and Future Heart Disease. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2020 Sep;47(3):487-495. DOI: 10.1016/j.ogc.2020.04.009.
9. May L. Cardiac Physiology of Pregnancy. *Compr Physiol*. 2015 Jul 1;5(3):1325-1344. DOI: 10.1002/cphy.c140043.
10. Petrie JR, Guzik TJ, Touyz RM. Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. *Can J Cardiol*. 2018 May;34(5):575-584. DOI: 10.1016/j.cjca.2017.12.005.
11. Querfeld U, Schaefer F. Cardiovascular risk factors in children on dialysis: an update. *Pediatr Nephrol*. 2020 Jan;35(1):41-57. DOI: 10.1007/s00467-018-4125-x.
12. Bozkurt B, Aguilar D, Deswal A, Dunbar SB, Francis GS, Horwich T, Jessup M, Kosiborod M, Pritchett AM, Ramasubbu K, Rosendorff C, Yancy C, American Heart Association Heart F, Transplantation Committee of the Council on Clinical C, Council on Cardiovascular S, Anesthesia, Council on C, Stroke N, Council on H, Council on Q, Outcomes R. Contributory Risk and Management of Comorbidities of Hypertension, Obesity, Diabetes Mellitus, Hyperlipidemia, and Metabolic Syndrome in Chronic Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2016 Dec 6;134(23):e535-e578. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000450.
13. Jagiela J, Bartnicki P, Rysz J. Selected cardiovascular risk factors in early stages of chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol*. 2020 Feb;52(2):303-314. DOI: 10.1007/s11255-019-02349-1.
14. Zhang L, She ZG, Li H, Zhang XJ. Non-alcoholic fatty liver disease: a metabolic burden promoting atherosclerosis. *Clin Sci (Lond)*. 2020 Jul 17;134(13):1775-1799. DOI: 10.1042/CS20200446.
15. Masson W, Lobo M, Molinero G. Psoriasis and Cardiovascular Risk: A Comprehensive Review. *Adv Ther*. 2020 May;37(5):2017-2033. DOI: 10.1007/s12325-020-01346-6.
16. Shah PK. Inflammation, infection and atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2019 Nov;29(8):468-472. DOI: 10.1016/j.tcm.2019.01.004.
17. Lechner K, von Schacky C, McKenzie AL, Worm N, Nixdorff U, Lechner B, Krankel N, Halle M, Krauss RM, Scherr J. Lifestyle factors and high-risk atherosclerosis: Pathways and mechanisms beyond traditional risk factors. *Eur J Prev Cardiol*. 2020 Mar;27(4):394-406. DOI: 10.1177/2047487319869400.
18. Torres N, Guevara-Cruz M, Velazquez-Villegas LA, Tovar AR. Nutrition and Atherosclerosis. *Arch Med Res*. 2015 Jul;46(5):408-426. DOI: 10.1016/j.arcmed.2015.05.010.
19. Paneni F, Diaz Canestro C, Libby P, Luscher TF, Camici GG. The Aging Cardiovascular System: Understanding It at the Cellular and Clinical Levels. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Apr 18;69(15):1952-1967. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.01.064.
20. Jakovljevic DG. Physical activity and cardiovascular aging: Physiological and molecular insights. *Exp Gerontol*. 2018 Aug;109:67-74. DOI: 10.1016/j.exger.2017.05.016.
21. Kovacic JC, Moreno P, Nabel EG, Hachinski V, Fuster V. Cellular senescence, vascular disease, and aging: part 2 of a 2-part review: clinical vascular disease in the elderly. *Circulation*. 2011 May 3;123(17):1900-1910. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.009118.
22. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, Tokgozoglu L, Lewis EF. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Aug 16;5(1):56. DOI: 10.1038/s41572-019-0106-z.

23. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):535-546. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307611.
24. Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet.* 2014 Mar 15;383(9921):999-1008. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61752-3.
25. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Delling FN, Djousse L, Elkind MSV, Ferguson JF, Fornage M, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Kwan TW, Lackland DT, Lewis TT, Lichtman JH, Longenecker CT, Loop MS, Lutsey PL, Martin SS, Matsushita K, Moran AE, Mussolino ME, Perak AM, Rosamond WD, Roth GA, Sampson UKA, Satou GM, Schroeder EB, Shah SH, Shay CM, Spartano NL, Stokes A, Tirschwell DL, VanWagner LB, Tsao CW, American Heart Association Council on E, Prevention Statistics C, Stroke Statistics S. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 2020 Mar 3;141(9):e139-e596. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000757.
26. David AR, Kershaw A, Heagerty A. Atherosclerosis and diet in ancient Egypt. *Lancet.* 2010 Feb 27;375(9716):718-719. DOI: 10.1016/s0140-6736(10)60294-2.
27. Nerlich AG, Egarter Vigl E, Fleckinger A, Tauber M, Peschel O. [The Iceman : Life scenarios and pathological findings from 30 years of research on the glacier mummy "Otzi"]. *Pathologe.* 2021 Jul 8; DOI: 10.1007/s00292-021-00961-6.
28. Nobel Prize Outreach AB. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1985. 2021. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1985/summary/> Accessed July 25, 2021
29. Brown MS, Goldstein JL. Heart attacks: gone with the century? *Science.* 1996 May 3;272(5262):629. DOI: 10.1126/science.272.5262.629.
30. Deutsche Herzstiftung 32 Deutscher Herzbericht 2020. 2021. <https://www.herzstiftung.de/e-paper/#193> Accessed July 25, 2021
31. World Health Organization. Health Topics Cardiovascular diseases. 2021. https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1 Accessed July 26, 2021
32. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, Barengo NC, Beaton AZ, Benjamin EJ, Benziger CP, Bonny A, Brauer M, Brodmann M, Cahill TJ, Carapetis J, Catapano AL, Chugh SS, Cooper LT, Coresh J, Criqui M, DeCleene N, Eagle KA, Emmons-Bell S, Feigin VL, Fernandez-Sola J, Fowkes G, Gakidou E, Grundy SM, He FJ, Howard G, Hu F, Inker L, Karthikeyan G, Kassebaum N, Koroshetz W, Lavie C, Lloyd-Jones D, Lu HS, Mirijello A, Temesgen AM, Mokdad A, Moran AE, Muntner P, Narula J, Neal B, Ntsekhe M, Moraes de Oliveira G, Otto C, Owolabi M, Pratt M, Rajagopalan S, Reitsma M, Ribeiro ALP, Rigotti N, Rodgers A, Sable C, Shakil S, Sliwa-Hahnle K, Stark B, Sundstrom J, Timpel P, Tleyjeh IM, Valgimigli M, Vos T, Whelton PK, Yacoub M, Zuhlke L, Murray C, Fuster V, Group G-N-JGBoCDW. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol.* 2020 Dec 22;76(25):2982-3021. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.11.010.
33. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature.* 2021 Apr;592(7855):524-533. DOI: 10.1038/s41586-021-03392-8.
34. Moore JX, Chaudhary N, Akinyemiju T. Metabolic Syndrome Prevalence by Race/Ethnicity and Sex in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-2012. *Prev Chronic Dis.* 2017 Mar 16;14E24. DOI: 10.5888/pcd14.160287.

35. Libby P, Bornfeldt KE, Tall AR. Atherosclerosis: Successes, Surprises, and Future Challenges. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):531-534. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308334.
36. Churov A, Summerhill V, Grechko A, Orekhova V, Orekhov A. MicroRNAs as Potential Biomarkers in Atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 7;20(22): DOI: 10.3390/ijms20225547.
37. Spence JD, Solo K. Resistant Atherosclerosis: The Need for Monitoring of Plaque Burden. *Stroke.* 2017 Jun;48(6):1624-1629. DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.017392.
38. Kirichenko TV, Markina YV, Sukhorukov VN, Khotina VA, Wu WK, Orekhov AN. A Novel Insight at Atherogenesis: The Role of Microbiome. *Front Cell Dev Biol.* 2020 8586189. DOI: 10.3389/fcell.2020.586189.
39. Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo JL, Gorbатов R, Sukhova GK, Gerhardt LM, Smyth D, Zavitz CC, Shikatani EA, Parsons M, van Rooijen N, Lin HY, Husain M, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med.* 2013 Sep;19(9):1166-1172. DOI: 10.1038/nm.3258.
40. Tabas I, Bornfeldt KE. Intracellular and Intercellular Aspects of Macrophage Immunometabolism in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2020 Apr 24;126(9):1209-1227. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315939.
41. Gistera A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol.* 2017 Jun;13(6):368-380. DOI: 10.1038/nrneph.2017.51.
42. Libby P. Inflammation in Atherosclerosis-No Longer a Theory. *Clin Chem.* 2021 Jan 8;67(1):131-142. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa275.
43. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):692-702. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306361.
44. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol.* 1995 57791-804. DOI: 10.1146/annurev.ph.57.030195.004043.
45. Poznyak AV, Nikiforov NG, Markin AM, Kashirskikh DA, Myasoedova VA, Gerasimova EV, Orekhov AN. Overview of OxLDL and Its Impact on Cardiovascular Health: Focus on Atherosclerosis. *Front Pharmacol.* 2020 11613780. DOI: 10.3389/fphar.2020.613780.
46. Hewing B, Landmesser U. LDL, HDL, VLDL, and CVD Prevention: Lessons from Genetics? *Curr Cardiol Rep.* 2015 Jul;17(7):610. DOI: 10.1007/s11886-015-0610-z.
47. Zakiev ER, Sukhorukov VN, Melnichenko AA, Sobenin IA, Ivanova EA, Orekhov AN. Lipid composition of circulating multiple-modified low density lipoprotein. *Lipids Health Dis.* 2016 Aug 24;15(1):134. DOI: 10.1186/s12944-016-0308-2.
48. Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):620-636. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
49. Boren J, Chapman MJ, Krauss RM, Packard CJ, Bentzon JF, Binder CJ, Daemen MJ, Demer LL, Hegele RA, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, Watts GF, Bruckert E, Fazio S, Ference BA, Graham I, Horton JD, Landmesser U, Laufs U, Masana L, Pasterkamp G, Raal FJ, Ray KK, Schunkert H, Taskinen MR, van de Sluis B, Wiklund O, Tokgozoglu L, Catapano AL, Ginsberg HN. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2020 Jun 21;41(24):2313-2330. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz962.
50. Barrett TJ. Macrophages in Atherosclerosis Regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020 Jan;40(1):20-33. DOI: 10.1161/ATVBAHA.119.312802.

51. Ridker PM, Koenig W, Kastelein JJ, Mach F, Luscher TF. Has the time finally come to measure hsCRP universally in primary and secondary cardiovascular prevention? *Eur Heart J*. 2018 Dec 7;39(46):4109-4111. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy723.
52. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 2014 Jun 5;510(7503):92-101. DOI: 10.1038/nature13479.
53. Schloss MJ, Swirski FK, Nahrendorf M. Modifiable Cardiovascular Risk, Hematopoiesis, and Innate Immunity. *Circ Res*. 2020 Apr 24;126(9):1242-1259. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.315936.
54. Christ A, Gunther P, Lauterbach MAR, Duewell P, Biswas D, Pelka K, Scholz CJ, Oosting M, Haendler K, Bassler K, Klee K, Schulte-Schrepping J, Ulas T, Moorlag S, Kumar V, Park MH, Joosten LAB, Groh LA, Riksen NP, Espevik T, Schlitzer A, Li Y, Fitzgerald ML, Netea MG, Schultze JL, Latz E. Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming. *Cell*. 2018 Jan 11;172(1-2):162-175 e114. DOI: 10.1016/j.cell.2017.12.013.
55. Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, O'Neill LA, Xavier RJ. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 2016 Apr 22;352(6284):aaf1098. DOI: 10.1126/science.aaf1098.
56. Moss JW, Ramji DP. Cytokines: roles in atherosclerosis disease progression and potential therapeutic targets. *Future Med Chem*. 2016 Jul;8(11):1317-1330. DOI: 10.4155/fmc-2016-0072.
57. Miano JM, Fisher EA, Majesky MW. Fate and State of Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation*. 2021 May 25;143(21):2110-2116. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.049922.
58. Basatemur GL, Jorgensen HF, Clarke MCH, Bennett MR, Mallat Z. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2019 Dec;16(12):727-744. DOI: 10.1038/s41569-019-0227-9.
59. Libby P, Hansson GK. Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: players and layers. *Circ Res*. 2015 Jan 16;116(2):307-311. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.301313.
60. Sage AP, Tsiantoulas D, Binder CJ, Mallat Z. The role of B cells in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2019 Mar;16(3):180-196. DOI: 10.1038/s41569-018-0106-9.
61. Chen YT, Yuan HX, Ou ZJ, Ou JS. Microparticles (Exosomes) and Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2020 May 28;22(6):23. DOI: 10.1007/s11883-020-00841-z.
62. Hergenreider E, Heydt S, Treguer K, Boettger T, Horrevoets AJ, Zeiher AM, Scheffer MP, Frangakis AS, Yin X, Mayr M, Braun T, Urbich C, Boon RA, Dimmeler S. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol*. 2012 Feb 12;14(3):249-256. DOI: 10.1038/ncb2441.
63. Rader DJ, Parmacek MS. Secreted miRNAs suppress atherogenesis. *Nat Cell Biol*. 2012 Feb 29;14(3):233-235. DOI: 10.1038/ncb2452.
64. Paone S, Baxter AA, Hulett MD, Poon IKH. Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci*. 2019 Mar;76(6):1093-1106. DOI: 10.1007/s00018-018-2983-9.
65. Poller W, Dimmeler S, Heymans S, Zeller T, Haas J, Karakas M, Leistner DM, Jakob P, Nakagawa S, Blankenberg S, Engelhardt S, Thum T, Weber C, Meder B, Hajjar R, Landmesser U. Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives. *Eur Heart J*. 2018 Aug 1;39(29):2704-2716. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx165.
66. Kulshreshtha A, Singh S, Ahmad M, Khanna K, Ahmad T, Agrawal A, Ghosh B. Simvastatin mediates inhibition of exosome synthesis, localization and secretion via multicomponent interventions. *Sci Rep*. 2019 Nov 8;9(1):16373. DOI: 10.1038/s41598-019-52765-7.

67. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2013 Aug 29;369(9):883-884. DOI: 10.1056/NEJMc1307806.
68. Leistner DM, Krankel N, Meteva D, Abdelwahed YS, Seppelt C, Stahli BE, Rai H, Skurk C, Lauten A, Mochmann HC, Frohlich G, Rauch-Krohnert U, Flores E, Riedel M, Sieronski L, Kia S, Strassler E, Haghikia A, Dirks F, Steiner JK, Mueller DN, Volk HD, Klotsche J, Joner M, Libby P, Landmesser U. Differential immunological signature at the culprit site distinguishes acute coronary syndrome with intact from acute coronary syndrome with ruptured fibrous cap: results from the prospective translational OPTICO-ACS study. *Eur Heart J.* 2020 Oct 1;41(37):3549-3560. DOI: 10.1093/eurheartj/ehaa703.
69. Franck G, Even G, Gautier A, Salinas M, Loste A, Procopio E, Gaston AT, Morvan M, Dupont S, Deschildre C, Berissi S, Laschet J, Nataf P, Nicoletti A, Michel JB, Caligiuri G. Haemodynamic stress-induced breaches of the arterial intima trigger inflammation and drive atherogenesis. *Eur Heart J.* 2019 Mar 14;40(11):928-937. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy822.
70. Doring Y, Soehnlein O, Weber C. Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis. *Circ Res.* 2017 Feb 17;120(4):736-743. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309692.
71. Williams MC, Kwiecinski J, Doris M, McElhinney P, D'Souza MS, Cadet S, Adamson PD, Moss AJ, Alam S, Hunter A, Shah ASV, Mills NL, Pawade T, Wang C, Weir McCall JR, Bonnici-Mallia M, Murrills C, Roditi G, van Beek EJR, Shaw LJ, Nicol ED, Berman DS, Slomka PJ, Newby DE, Dweck MR, Dey D. Sex-Specific Computed Tomography Coronary Plaque Characterization and Risk of Myocardial Infarction. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2021 Apr 7; DOI: 10.1016/j.jcmg.2021.03.004.
72. Foley JH. Plasmin(ogen) at the Nexus of Fibrinolysis, Inflammation, and Complement. *Semin Thromb Hemost.* 2017 Mar;43(2):135-142. DOI: 10.1055/s-0036-1592302.
73. Fuhrman B. The urokinase system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2012 May;222(1):8-14. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.10.044.
74. Mondino A, Blasi F. uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. *Trends Immunol.* 2004 Aug;25(8):450-455. DOI: 10.1016/j.it.2004.06.004.
75. Kusch A, Gulba DC. [Significance of the uPA/uPAR system for development of arteriosclerosis and restenosis]. *Z Kardiol.* 2001 May;90(5):307-318. DOI: 10.1007/s003920170160.
76. Tkachuk VA, Plekhanova OS, Parfyonova YV. Regulation of arterial remodeling and angiogenesis by urokinase-type plasminogen activator. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009 Apr;87(4):231-251. DOI: 10.1139/Y08-113.
77. Kienast J, Padro T, Steins M, Li CX, Schmid KW, Hammel D, Scheld HH, van de Loo JC. Relation of urokinase-type plasminogen activator expression to presence and severity of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Thromb Haemost.* 1998 Mar;79(3):579-586.
78. Steins MB, Padro T, Schwaenen C, Ruiz S, Mesters RM, Berdel WE, Kienast J. Overexpression of urokinase receptor and cell surface urokinase-type plasminogen activator in the human vessel wall with different types of atherosclerotic lesions. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2004 Jul;15(5):383-391. DOI: 10.1097/01.mbc.0000114441.59147.56.
79. Hu JH, Touch P, Zhang J, Wei H, Liu S, Lund IK, Hoyer-Hansen G, Dichek DA. Reduction of mouse atherosclerosis by urokinase inhibition or with a limited-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor. *Cardiovasc Res.* 2015 Mar 1;105(3):372-382. DOI: 10.1093/cvr/cvv007.
80. Kremen M, Krishnan R, Emery I, Hu JH, Slezicki KI, Wu A, Qian K, Du L, Plawman A, Stempien-Otero A, Dichek DA. Plasminogen mediates the atherogenic effects of

- macrophage-expressed urokinase and accelerates atherosclerosis in apoE-knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Nov 4;105(44):17109-17114. DOI: 10.1073/pnas.0808650105.
81. Krishnan R, Kremen M, Hu JH, Emery I, Farris SD, Slezicki KI, Chu T, Du L, Dichek HL, Dichek DA. Level of macrophage uPA expression is an important determinant of atherosclerotic lesion growth in ApoE^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Nov;29(11):1737-1744. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.195529.
 82. Carmeliet P, Moons L, Ploplis V, Plow E, Collen D. Impaired arterial neointima formation in mice with disruption of the plasminogen gene. *J Clin Invest*. 1997 Jan 15;99(2):200-208. DOI: 10.1172/JCI119148.
 83. Cozen AE, Moriwaki H, Kremen M, DeYoung MB, Dichek HL, Slezicki KI, Young SG, Veniant M, Dichek DA. Macrophage-targeted overexpression of urokinase causes accelerated atherosclerosis, coronary artery occlusions, and premature death. *Circulation*. 2004 May 4;109(17):2129-2135. DOI: 10.1161/01.CIR.0000127369.24127.03.
 84. Fuhrman B, Nitzan O, Karry R, Volkova N, Dumler I, Aviram M. Urokinase plasminogen activator (uPA) stimulates cholesterol biosynthesis in macrophages through activation of SREBP-1 in a PI3-kinase and MEK-dependent manner. *Atherosclerosis*. 2007 Dec;195(2):e108-116. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.06.025.
 85. Kusch A. "Linking proteolysis to lipids". *Thromb Res*. 2008 123(2):191-193. DOI: 10.1016/j.thromres.2008.06.001.
 86. Smith HW, Marshall CJ. Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Jan;11(1):23-36. DOI: 10.1038/nrm2821.
 87. Rovina N, Akinosoglou K, Eugen-Olsen J, Hayek S, Reiser J, Giamarellos-Bourboulis EJ. Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) as an early predictor of severe respiratory failure in patients with COVID-19 pneumonia. *Crit Care*. 2020 Apr 30;24(1):187. DOI: 10.1186/s13054-020-02897-4.
 88. Hayek SS, Sever S, Ko YA, Trachtman H, Awad M, Wadhvani S, Altintas MM, Wei C, Hotton AL, French AL, Sperling LS, Lerakis S, Quyyumi AA, Reiser J. Soluble Urokinase Receptor and Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med*. 2015 Nov 12;373(20):1916-1925. DOI: 10.1056/NEJMoa1506362.
 89. Mauro CD, Pesapane A, Formisano L, Rosa R, D'Amato V, Ciciola P, Servetto A, Marciano R, Orsini RC, Monteleone F, Zambrano N, Fontanini G, Servadio A, Pignataro G, Grumetto L, Lavecchia A, Bruzzese D, Iaccarino A, Troncione G, Veneziani BM, Montuori N, Placido S, Bianco R. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression enhances invasion and metastasis in RAS mutated tumors. *Sci Rep*. 2017 Aug 24;7(1):9388. DOI: 10.1038/s41598-017-10062-1.
 90. Larmann J, Jurk K, Janssen H, Muller M, Herzog C, Lorenz A, Schmitz M, Nofer JR, Theilmeyer G. Hepatic Overexpression of Soluble Urokinase Receptor (uPAR) Suppresses Diet-Induced Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient (LDLR^{-/-}) Mice. *PLoS One*. 2015 10(8):e0131854. DOI: 10.1371/journal.pone.0131854.
 91. Mekonnen G, Corban MT, Hung OY, Eshtehardi P, Eapen DJ, Al-Kassem H, Rasoul-Arzrumly E, Gogas BD, McDaniel MC, Pielak T, Thorball CW, Sperling L, Quyyumi AA, Samady H. Plasma soluble urokinase-type plasminogen activator receptor level is independently associated with coronary microvascular function in patients with non-obstructive coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2015 Mar;239(1):55-60. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.025.
 92. Olson FJ, Thurison T, Ryndel M, Hoyer-Hansen G, Fagerberg B. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor forms in plasma as markers of atherosclerotic

- plaque vulnerability. *Clin Biochem.* 2010 Jan;43(1-2):124-130. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2009.09.028.
93. Sehestedt T, Lyngbaek S, Eugen-Olsen J, Jeppesen J, Andersen O, Hansen TW, Linneberg A, Jorgensen T, Haugaard SB, Olsen MH. Soluble urokinase plasminogen activator receptor is associated with subclinical organ damage and cardiovascular events. *Atherosclerosis.* 2011 May;216(1):237-243. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.049.
 94. Emrah A, Akin, II, Servet I, Muzaffer K, Fatih YM, Yeliz G, Cagan ES, Ahmet G, Alev K, Cevat K. Increased circulating soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) levels in patients with slow coronary flow. *Arch Med Sci Atheroscler Dis.* 2016 1(1):e53-e59. DOI: 10.5114/amsad.2016.60819.
 95. Edsfeldt A, Nitulescu M, Grufman H, Gronberg C, Persson A, Nilsson M, Persson M, Bjorkbacka H, Goncalves I. Soluble urokinase plasminogen activator receptor is associated with inflammation in the vulnerable human atherosclerotic plaque. *Stroke.* 2012 Dec;43(12):3305-3312. DOI: 10.1161/STROKEAHA.112.664094.
 96. Dumler I, Weis A, Mayboroda OA, Maasch C, Jerke U, Haller H, Gulba DC. The Jak/Stat pathway and urokinase receptor signaling in human aortic vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1998 Jan 2;273(1):315-321. DOI: 10.1074/jbc.273.1.315.
 97. Dumler I, Kopmann A, Weis A, Mayboroda OA, Wagner K, Gulba DC, Haller H. Urokinase activates the Jak/Stat signal transduction pathway in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Feb;19(2):290-297. DOI: 10.1161/01.atv.19.2.290.
 98. Kusch A, Tkachuk S, Haller H, Dietz R, Gulba DC, Lipp M, Dumler I. Urokinase stimulates human vascular smooth muscle cell migration via a phosphatidylinositol 3-kinase-Tyk2 interaction. *J Biol Chem.* 2000 Dec 15;275(50):39466-39473. DOI: 10.1074/jbc.M003626200.
 99. Kusch A, Tkachuk S, Lutter S, Haller H, Dietz R, Lipp M, Dumler I. Monocyte-expressed urokinase regulates human vascular smooth muscle cell migration in a coculture model. *Biol Chem.* 2002 Jan;383(1):217-221. DOI: 10.1515/BC.2002.022.
 100. Adams LD, Lemire JM, Schwartz SM. A systematic analysis of 40 random genes in cultured vascular smooth muscle subtypes reveals a heterogeneity of gene expression and identifies the tight junction gene zonula occludens 2 as a marker of epithelioid "pup" smooth muscle cells and a participant in carotid neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Nov;19(11):2600-2608. DOI: 10.1161/01.atv.19.11.2600.
 101. Martin KA, Rzczidlo EM, Merenick BL, Fingar DC, Brown DJ, Wagner RJ, Powell RJ. The mTOR/p70 S6K1 pathway regulates vascular smooth muscle cell differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Mar;286(3):C507-517. DOI: 10.1152/ajpcell.00201.2003.
 102. Hegner B, Lange M, Kusch A, Essin K, Sezer O, Schulze-Lohoff E, Luft FC, Gollasch M, Dragun D. mTOR regulates vascular smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Feb;29(2):232-238. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.179457.
 103. Gurgun D, Kusch A, Klewitz R, Hoff U, Catar R, Hegner B, Kintscher U, Luft FC, Dragun D. Sex-specific mTOR signaling determines sexual dimorphism in myocardial adaptation in normotensive DOCA-salt model. *Hypertension.* 2013 Mar;61(3):730-736. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00276.
 104. Yang W, Warrington NM, Taylor SJ, Whitmire P, Carrasco E, Singleton KW, Wu N, Lathia JD, Berens ME, Kim AH, Barnholtz-Sloan JS, Swanson KR, Luo J, Rubin JB. Sex differences in GBM revealed by analysis of patient imaging, transcriptome, and survival data. *Sci Transl Med.* 2019 Jan 2;11(473): DOI: 10.1126/scitranslmed.aao5253.

105. Zucker I, Beery AK. Males still dominate animal studies. *Nature*. 2010 Jun 10;465(7299):690. DOI: 10.1038/465690a.
106. Seavey MM, Dobrzanski P. The many faces of Janus kinase. *Biochem Pharmacol*. 2012 May 1;83(9):1136-1145. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.12.024.
107. Fenyo IM, Florea IC, Raicu M, Manea A. Tyrphostin AG490 reduces NADPH oxidase activity and expression in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *Vascul Pharmacol*. 2011 Mar-Jun;54(3-6):100-106. DOI: 10.1016/j.vph.2011.03.006.
108. Carmeliet P, Collen D. Development and disease in proteinase-deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system. *Thromb Res*. 1998 Sep 15;91(6):255-285. DOI: 10.1016/s0049-3848(98)00122-4.
109. Carmeliet P, Moons L, Herbert JM, Crawley J, Lupu F, Lijnen R, Collen D. Urokinase but not tissue plasminogen activator mediates arterial neointima formation in mice. *Circ Res*. 1997 Nov;81(5):829-839. DOI: 10.1161/01.res.81.5.829.
110. Blasi F. The urokinase receptor. A cell surface, regulated chemokine. *APMIS*. 1999 Jan;107(1):96-101. DOI: 10.1111/j.1699-0463.1999.tb01531.x.
111. Lin S, Li X, Zhang J, Zhang Y. Omentin-1: Protective impact on ischemic stroke via ameliorating atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2021 Jun;51731-40. DOI: 10.1016/j.cca.2021.02.004.
112. Park HS, Quan KT, Han JH, Jung SH, Lee DH, Jo E, Lim TW, Heo KS, Na M, Myung CS. Rubiarbonone C inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells through the focal adhesion kinase, MAPK and STAT3 Tyr(705) signalling pathways. *Br J Pharmacol*. 2017 Nov;174(22):4140-4154. DOI: 10.1111/bph.13986.
113. Song HT, Cui Y, Zhang LL, Cao G, Li L, Li G, Jia XJ. Ruxolitinib attenuates intimal hyperplasia via inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway activation induced by PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *Microvasc Res*. 2020 Nov;132104060. DOI: 10.1016/j.mvr.2020.104060.
114. Zhang L, Shao J, Zhou Y, Chen H, Qi H, Wang Y, Chen L, Zhu Y, Zhang M, Chen L, Du Y, Zhong M, Shi X, Li Q. Inhibition of PDGF-BB-induced proliferation and migration in VSMCs by proanthocyanidin A2: Involvement of KDR and Jak-2/STAT-3/cPLA2 signaling pathways. *Biomed Pharmacother*. 2018 Feb;98847-855. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.010.
115. Wijaya I, Andhika R, Huang I, Purwiga A, Budiman KY, Bashari MH, Reniarti L, Roesli RMA. The use of Janus Kinase inhibitors in hospitalized patients with COVID-19: Systematic review and meta-analysis. *Clin Epidemiol Glob Health*. 2021 Jul-Sep;11100755. DOI: 10.1016/j.cegh.2021.100755.
116. Grant AH, Estrada A, 3rd, Ayala-Marin YM, Alvidrez-Camacho AY, Rodriguez G, Robles-Escajeda E, Cadena-Medina DA, Rodriguez AC, Kirken RA. The Many Faces of JAKs and STATs Within the COVID-19 Storm. *Front Immunol*. 2021 12690477. DOI: 10.3389/fimmu.2021.690477.
117. Kotyla PJ, Islam MA, Engelmann M. Clinical Aspects of Janus Kinase (JAK) Inhibitors in the Cardiovascular System in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 7;21(19): DOI: 10.3390/ijms21197390.
118. Wang L, Hu Y, Song B, Xiong Y, Wang J, Chen D. Targeting JAK/STAT signaling pathways in treatment of inflammatory bowel disease. *Inflamm Res*. 2021 Jul;70(7):753-764. DOI: 10.1007/s00011-021-01482-x.
119. Krueger JG, McInnes IB, Blauvelt A. Tyrosine Kinase 2 and Janus Kinase Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling and Inhibition in Plaque Psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 2021 Jul 2; DOI: 10.1016/j.jaad.2021.06.869.

120. Nobel YR, Stier K, Krishnareddy S. STAT signaling in the intestine. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2021 3611-20. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2021.02.001.
121. Yan Z, Gibson SA, Buckley JA, Qin H, Benveniste EN. Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases. *Clin Immunol.* 2018 Apr;1894-13. DOI: 10.1016/j.clim.2016.09.014.
122. Hromadova D, Elewaut D, Inman RD, Strobl B, Gracey E. From Science to Success? Targeting Tyrosine Kinase 2 in Spondyloarthritis and Related Chronic Inflammatory Diseases. *Front Genet.* 2021 12685280. DOI: 10.3389/fgene.2021.685280.
123. Roger I, Milara J, Montero P, Cortijo J. The Role of JAK/STAT Molecular Pathway in Vascular Remodeling Associated with Pulmonary Hypertension. *Int J Mol Sci.* 2021 May 7;22(9): DOI: 10.3390/ijms22094980.
124. Parra-Izquierdo I, Sanchez-Bayuela T, Castanos-Mollor I, Lopez J, Gomez C, San Roman JA, Sanchez Crespo M, Garcia-Rodriguez C. Clinically used JAK inhibitor blunts dsRNA-induced inflammation and calcification in aortic valve interstitial cells. *FEBS J.* 2021 May 19; DOI: 10.1111/febs.16026.
125. Kalanovic, D. Rote-Hand-Brief Xeljanz (Tofacitinib). 2021. <https://www.doccheck.com/de/detail/documents/6430-rote-hand-brief-tovacitinib> Accessed August 11, 2021.
126. Zhao Y, Qian Y, Sun Z, Shen X, Cai Y, Li L, Wang Z. Role of PI3K in the Progression and Regression of Atherosclerosis. *Front Pharmacol.* 2021 12632378. DOI: 10.3389/fphar.2021.632378.
127. Shin SS, Ko MC, Noh DH, Hwang B, Park Y, Park SL, Kim WJ, Moon SK. Morin inhibits PDGF-induced proliferation, migration, and invasion of vascular smooth muscle cells via modulating p27KIP1, AKT, and MMP-9 activities. *Gen Physiol Biophys.* 2018 Sep;37(6):633-645. DOI: 10.4149/gpb_2018028.
128. Kunigal S, Kusch A, Tkachuk N, Tkachuk S, Jerke U, Haller H, Dumler I. Monocyte-expressed urokinase inhibits vascular smooth muscle cell growth by activating Stat1. *Blood.* 2003 Dec 15;102(13):4377-4383. DOI: 10.1182/blood-2002-12-3872.
129. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009 Nov;9(11):798-809. DOI: 10.1038/nrc2734.
130. Villarino AV, Kanno Y, Ferdinand JR, O'Shea JJ. Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease. *J Immunol.* 2015 Jan 1;194(1):21-27. DOI: 10.4049/jimmunol.1401867.
131. Kusch A, Tkachuk S, Tkachuk N, Patecki M, Park JK, Dietz R, Haller H, Dumler I. The tight junction protein ZO-2 mediates proliferation of vascular smooth muscle cells via regulation of Stat1. *Cardiovasc Res.* 2009 Jul 1;83(1):115-122. DOI: 10.1093/cvr/cvp117.
132. Diaz-Coranguéz M, Liu X, Antonetti DA. Tight Junctions in Cell Proliferation. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 27;20(23): DOI: 10.3390/ijms20235972.
133. Weerackoon N, Gunawardhana KL, Mani A. Wnt Signaling Cascades and Their Role in Coronary Artery Health and Disease. *J Cell Signal.* 2021 2(1):52-62. DOI: 10.33696/Signaling.2.035.
134. Low EL, Baker AH, Bradshaw AC. TGFbeta, smooth muscle cells and coronary artery disease: a review. *Cell Signal.* 2019 Jan;5390-101. DOI: 10.1016/j.cellsig.2018.09.004.
135. Cai Y, Yao H, Sun Z, Wang Y, Zhao Y, Wang Z, Li L. Role of NFAT in the Progression of Diabetic Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med.* 2021 8635172. DOI: 10.3389/fcvm.2021.635172.
136. Shankman LS, Gomez D, Cherepanova OA, Salmon M, Alencar GF, Haskins RM, Swiatlowska P, Newman AA, Greene ES, Straub AC, Isakson B, Randolph GJ, Owens GK. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in

- atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat Med*. 2015 Jun;21(6):628-637. DOI: 10.1038/nm.3866.
137. Li D, Chen A, Lan T, Zou Y, Zhao L, Yang P, Qu H, Wei L, Varghese Z, Moorhead JF, Chen Y, Ruan XZ. SCAP knockdown in vascular smooth muscle cells alleviates atherosclerosis plaque formation via up-regulating autophagy in ApoE(-/-) mice. *FASEB J*. 2019 Mar;33(3):3437-3450. DOI: 10.1096/fj.201800975RRR.
 138. Alencar GF, Owsiany KM, Karnewar S, Sukhavasi K, Mocci G, Nguyen AT, Williams CM, Shamsuzzaman S, Mokry M, Henderson CA, Haskins R, Baylis RA, Finn AV, McNamara CA, Zunder ER, Venkata V, Pasterkamp G, Bjorkegren J, Bekiranov S, Owens GK. Stem Cell Pluripotency Genes Klf4 and Oct4 Regulate Complex SMC Phenotypic Changes Critical in Late-Stage Atherosclerotic Lesion Pathogenesis. *Circulation*. 2020 Nov 24;142(21):2045-2059. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046672.
 139. Pan H, Xue C, Auerbach BJ, Fan J, Bashore AC, Cui J, Yang DY, Trignano SB, Liu W, Shi J, Ihuegbu CO, Bush EC, Worley J, Vlahos L, Laise P, Solomon RA, Connolly ES, Califano A, Sims PA, Zhang H, Li M, Reilly MP. Single-Cell Genomics Reveals a Novel Cell State During Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Potential Therapeutic Targets for Atherosclerosis in Mouse and Human. *Circulation*. 2020 Nov 24;142(21):2060-2075. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048378.
 140. Kiyani J, Kusch A, Tkachuk S, Kramer J, Haller H, Dietz R, Smith G, Dumler I. Rosuvastatin regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in vascular remodeling: role for the urokinase receptor. *Atherosclerosis*. 2007 Dec;195(2):254-261. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.12.030.
 141. Stach K, Nguyen XD, Lang S, Elmas E, Weiss C, Borggreffe M, Fischer J, Kalsch T. Simvastatin and atorvastatin attenuate VCAM-1 and uPAR expression on human endothelial cells and platelet surface expression of CD40 ligand. *Cardiol J*. 2012 19(1):20-28. DOI: 10.5603/cj.2012.0005.
 142. Niedzielski M, Broncel M, Gorzelak-Pabis P, Wozniak E. New possible pharmacological targets for statins and ezetimibe. *Biomed Pharmacother*. 2020 Sep;129:110388. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110388.
 143. Zimmermann F, Roessler J, Schmidt D, Jasina A, Schumann P, Gast M, Poller W, Leistner D, Giral H, Krankel N, Kratzer A, Schuchardt S, Heimesaat MM, Landmesser U, Haghikia A. Impact of the Gut Microbiota on Atorvastatin Mediated Effects on Blood Lipids. *J Clin Med*. 2020 May 25;9(5): DOI: 10.3390/jcm9051596.
 144. Kansakar U, Jankauskas SS, Gambardella J, Santulli G. Targeting the phenotypic switch of vascular smooth muscle cells to tackle atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2021 May;324:117-120. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.03.034.
 145. Kiyani Y, Limbourg A, Kiyani R, Tkachuk S, Limbourg FP, Ovsianikov A, Chichkov BN, Haller H, Dumler I. Urokinase receptor associates with myocardin to control vascular smooth muscle cells phenotype in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Jan;32(1):110-122. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.234369.
 146. Kiyani Y, Tkachuk S, Hilfiker-Kleiner D, Haller H, Fuhrman B, Dumler I. oxLDL induces inflammatory responses in vascular smooth muscle cells via urokinase receptor association with CD36 and TLR4. *J Mol Cell Cardiol*. 2014 Jan;66:72-82. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.11.005.
 147. Lugano R, Pena E, Badimon L, Padro T. Aggregated low-density lipoprotein induce impairment of the cytoskeleton dynamics through urokinase-type plasminogen activator/urokinase-type plasminogen activator receptor in human vascular smooth muscle cell. *J Thromb Haemost*. 2012 Oct;10(10):2158-2167. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2012.04896.x.

148. Yang C, Xiao X, Huang L, Zhou F, Chen LH, Zhao YY, Qu SL, Zhang C. Role of Kruppel-like factor 4 in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2021 Jan;512:135-141. DOI: 10.1016/j.cca.2020.11.002.
149. Cherepanova OA, Gomez D, Shankman LS, Swiatlowska P, Williams J, Sarmiento OF, Alencar GF, Hess DL, Bevard MH, Greene ES, Murgai M, Turner SD, Geng YJ, Bekiranov S, Connelly JJ, Tomilin A, Owens GK. Activation of the pluripotency factor OCT4 in smooth muscle cells is atheroprotective. *Nat Med*. 2016 Jun;22(6):657-665. DOI: 10.1038/nm.4109.
150. Luo Z, Xu W, Ma S, Qiao H, Gao L, Zhang R, Yang B, Qiu Y, Chen J, Zhang M, Tao B, Cao F, Wang Y. Moderate Autophagy Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Senescence to Stabilize Progressed Atherosclerotic Plaque via the mTORC1/ULK1/ATG13 Signal Pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2017 2017:3018190. DOI: 10.1155/2017/3018190.
151. Grootaert MOJ, Moulis M, Roth L, Martinet W, Vindis C, Bennett MR, De Meyer GRY. Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2018 Mar 15;114(4):622-634. DOI: 10.1093/cvr/cvy007.
152. Habib A, Finn AV. Antiproliferative Drugs for Restenosis Prevention. *Interv Cardiol Clin*. 2016 Jul;5(3):321-329. DOI: 10.1016/j.iccl.2016.02.002.
153. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, Byrne RA, Collet JP, Falk V, Head SJ, Juni P, Kastrati A, Koller A, Kristensen SD, Niebauer J, Richter DJ, Seferovic PM, Sibbing D, Stefanini GG, Windecker S, Yadav R, Zembala MO, Group ESCSD. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J*. 2019 Jan 7;40(2):87-165. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy394.
154. Paoletti E. mTOR Inhibition and Cardiovascular Diseases: Cardiac Hypertrophy. *Transplantation*. 2018 Feb;102(2S Suppl 1):S41-S43. DOI: 10.1097/TP.0000000000001691.
155. Buss SJ, Muenz S, Riffel JH, Malekar P, Hagenmueller M, Weiss CS, Bea F, Bekeredjian R, Schinke-Braun M, Izumo S, Katus HA, Hardt SE. Beneficial effects of Mammalian target of rapamycin inhibition on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Dec 15;54(25):2435-2446. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.08.031.
156. McMullen JR, Sherwood MC, Tarnavski O, Zhang L, Dorfman AL, Shioi T, Izumo S. Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation*. 2004 Jun 22;109(24):3050-3055. DOI: 10.1161/01.CIR.0000130641.08705.45.
157. Shioi T, McMullen JR, Tarnavski O, Converso K, Sherwood MC, Manning WJ, Izumo S. Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation*. 2003 Apr 1;107(12):1664-1670. DOI: 10.1161/01.CIR.0000057979.36322.88.
158. Gao XM, Wong G, Wang B, Kiriazis H, Moore XL, Su YD, Dart A, Du XJ. Inhibition of mTOR reduces chronic pressure-overload cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Hypertens*. 2006 Aug;24(8):1663-1670. DOI: 10.1097/01.hjh.0000239304.01496.83.
159. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017 Mar 9;168(6):960-976. DOI: 10.1016/j.cell.2017.02.004.
160. Liu GY, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Apr;21(4):183-203. DOI: 10.1038/s41580-019-0199-y.
161. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005 Feb 18;307(5712):1098-1101. DOI: 10.1126/science.1106148.
162. Harston RK, McKillop JC, Moschella PC, Van Laer A, Quinones LS, Baicu CF, Balasubramanian S, Zile MR, Kuppaswamy D. Rapamycin treatment augments both protein ubiquitination and Akt activation in pressure-overloaded rat myocardium. *Am J*

- Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 May;300(5):H1696-1706. DOI: 10.1152/ajpheart.00545.2010.
163. Kemi OJ, Ceci M, Wisloff U, Grimaldi S, Gallo P, Smith GL, Condorelli G, Ellingsen O. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol.* 2008 Feb;214(2):316-321. DOI: 10.1002/jcp.21197.
 164. Kaesler N, Babler A, Floege J, Kramann R. Cardiac Remodeling in Chronic Kidney Disease. *Toxins (Basel).* 2020 Mar 5;12(3): DOI: 10.3390/toxins12030161.
 165. Xu L, Brink M. mTOR, cardiomyocytes and inflammation in cardiac hypertrophy. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jul;1863(7 Pt B):1894-1903. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.01.003.
 166. Volkens M, Konstandin MH, Doroudgar S, Toko H, Quijada P, Din S, Joyo A, Ornelas L, Samse K, Thuerauf DJ, Gude N, Glembotski CC, Sussman MA. Mechanistic target of rapamycin complex 2 protects the heart from ischemic damage. *Circulation.* 2013 Nov 5;128(19):2132-2144. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003638.
 167. Sciarretta S, Zhai P, Maejima Y, Del Re DP, Nagarajan N, Yee D, Liu T, Magnuson MA, Volpe M, Frati G, Li H, Sadoshima J. mTORC2 regulates cardiac response to stress by inhibiting MST1. *Cell Rep.* 2015 Apr 7;11(1):125-136. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.03.010.
 168. Dworatzek E, Mahmoodzadeh S, Schubert C, Westphal C, Leber J, Kusch A, Kararigas G, Fliegner D, Moulin M, Ventura-Clapier R, Gustafsson JA, Davidson MM, Dragun D, Regitz-Zagrosek V. Sex differences in exercise-induced physiological myocardial hypertrophy are modulated by oestrogen receptor beta. *Cardiovasc Res.* 2014 Jun 1;102(3):418-428. DOI: 10.1093/cvr/cvu065.
 169. Gurgun D, Hegner B, Kusch A, Catar R, Chaykovska L, Hoff U, Gross V, Slowinski T, da Costa Goncalves AC, Kintscher U, Gustafsson JA, Luft FC, Dragun D. Estrogen receptor-beta signals left ventricular hypertrophy sex differences in normotensive deoxycorticosterone acetate-salt mice. *Hypertension.* 2011 Mar;57(3):648-654. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.166157.
 170. Kusch A, Schmidt M, Gurgun D, Postpieszala D, Catar R, Hegner B, Davidson MM, Mahmoodzadeh S, Dragun D. 17 β -Estradiol regulates mTORC2 sensitivity to rapamycin in adaptive cardiac remodeling. *PLoS One.* 2015 10(4):e0123385. DOI: 10.1371/journal.pone.0123385.
 171. Le TY, Ashton AW, Mardini M, Stanton PG, Funder JW, Handelsman DJ, Mihailidou AS. Role of androgens in sex differences in cardiac damage during myocardial infarction. *Endocrinology.* 2014 Feb;155(2):568-575. DOI: 10.1210/en.2013-1755.
 172. Rodriguez KA, Dodds SG, Strong R, Galvan V, Sharp ZD, Buffenstein R. Divergent tissue and sex effects of rapamycin on the proteasome-chaperone network of old mice. *Front Mol Neurosci.* 2014 783. DOI: 10.3389/fnmol.2014.00083.
 173. Hima L, Patel MN, Kannan T, Gour S, Pratap UP, Priyanka HP, Vasantharekha R, ThyagaRajan S. Age-associated decline in neural, endocrine, and immune responses in men and women: Involvement of intracellular signaling pathways. *J Neuroimmunol.* 2020 Aug 15;345577290. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2020.577290.
 174. Norris CM, Yip CYY, Nerenberg KA, Clavel MA, Pacheco C, Foulds HJA, Hardy M, Gonsalves CA, Jaffer S, Parry M, Colella TJF, Dhukai A, Grewal J, Price JAD, Levinsson ALE, Hart D, Harvey PJ, Van Spall HGC, Sarfi H, Sedlak TL, Ahmed SB, Baer C, Coutinho T, Edwards JD, Green CR, Kirkham AA, Srivaratharajah K, Dumanski S, Keeping-Burke L, Lappa N, Reid RD, Robert H, Smith G, Martin-Rhee M, Mulvagh SL. State of the Science in Women's Cardiovascular Disease: A Canadian Perspective on the Influence of Sex and Gender. *J Am Heart Assoc.* 2020 Feb 18;9(4):e015634. DOI: 10.1161/JAHA.119.015634.

175. Man JJ, Beckman JA, Jaffe IZ. Sex as a Biological Variable in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2020 Apr 24;126(9):1297-1319. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.315930.
176. Agarwala A, Michos ED, Samad Z, Ballantyne CM, Virani SS. The Use of Sex-Specific Factors in the Assessment of Women's Cardiovascular Risk. *Circulation.* 2020 Feb 18;141(7):592-599. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043429.

Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei meiner früheren Kollegin und späteren Arbeitsgruppenleiterin und Mentorin Frau Prof. Dr. Duska Dragun für ihre langjährige, unentwegte Unterstützung bedanken, die mir die Fortsetzung meiner Forschungsarbeiten ermöglichte und mich in meiner wissenschaftlichen Weiterentwicklung mit ihren Ideen und Diskussionen maßgeblich voranbrachte. Leider konnte weder sie, noch mein langjähriger klinischer Mentor, Herr Prof. Dr. Rainer Dietz, der ebenso viel zu früh an schwerer Krankheit verstarb, mich bis zum Abschluss meiner Habilitation begleiten.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Britta Siegmund, die mich im Weiteren bei der Fortsetzung meines Habilitationsvorhabens klinisch und wissenschaftlich uneingeschränkt unterstützt und beratend zur Seite gestanden hat.

Ganz besonderen Dank möchte ich auch meiner langjährigen Arbeitsgruppenleiterin Frau Prof. Dr. Inna Dumler aussprechen, die mir nach meiner Promotion exzellente Grundlagenforschung vermittelt hat, mich weiter für die Erforschung von Signaltransduktionsmechanismen, biochemische und zellbiologische Experimente begeistert und die Ergebnisse stets kritisch zu hinterfragen gelehrt hat.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Bernhard Rauch, Prof. Dr. Feraydon Niroomand, Prof. Prof. Dr. Dietrich C. Gulba, Dr. Jürgen Waigand, Dr. Frank Uhlich, Prof. Dr. Hermann Haller, Prof. Dr. Friedrich Luft, Prof. Dr. Wolf-Dieter Ludwig, PD Dr. Peter Reichardt, PD Dr. Andreas Kahl, Prof. Dr. Clemens Budde, Prof. Dr. Kai-Uwe Eckardt, Prof. Dr. Christian M. Spahn und Prof. Dr. Tobias B. Huber, die mich klinisch und/oder wissenschaftlich ausgebildet, bzw. auf vielfältige Weise besonders unterstützt haben.

Dank gilt meinen vielen Arbeitsgruppenkolleginnen und Kollegen Dr. Uwe Jerke, Prof. Dr. Ralf Dechend, Dr. Sergej Tkachuk, Dr. Yulia Kiyam, Dr. Uwe Hoff, Dr. Björn Hegner, Dr. Dennis Gürgen, Dr. Rusan Catar, Dr. Aurélie Philippe, Dr. Anett Unbehaun und denen, die ich hier nicht alle namentlich aufführen konnte, mit denen wir gleichermaßen fruchtbare wissenschaftliche Diskussionen, wie auch viel Spaß bei der Arbeit und in der Freizeit hatten. Ebenso Dank an die vielen Doktorandinnen und Doktoranden –Markus von Schaewen, Margret Patecki, Maria Schmidt, Oskar Wischnewski, Philine Wagner, Nelli Beiner, Peng Ren, Ola Al'Diab, Judith Kliegel, die ich mitbetreuen durfte und für ihre großartige Unterstützung bei den Projekten, sowie Jana Treutler, Steffen Lutter und Marc Eigen für exzellente technische Unterstützungen im Labor.

Abschließend möchte ich vor allem meinen Eltern und meiner Familie danken, die mich stets bei allen Ideen und Zielen voll Liebe, Fürsorge und Verständnis unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....
Datum

.....
Unterschrift